



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOSIANE DA SILVA QUETZ

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO, IMUNOENZIMÁTICO E MOLECULAR E PERFIL  
DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Campylobacter*

FORTALEZA

2013

JOSIANE DA SILVA QUETZ

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO, IMUNOENZIMÁTICO E MOLECULAR E PERFIL  
DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Campylobacter*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

Q55d

Quetz, Josiane da Silva.

Diagnóstico microbiológico, imunoenzimático e molecular e perfil de genes associados à virulência de *Campylobacter* / Josiane da Silva Quetz. – 2013.

164 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.

1. Diarreia Infantil. 2. *Campylobacter*. 3. Virulência 4. Diagnóstico. I. Título.

---

CDD 618.923427

JOSIANE DA SILVA QUETZ

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO, IMUNOENZIMÁTICO E MOLECULAR E PERFIL DE GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Campylobacter*

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 20 de setembro de 2013.

---

Prof. Dr. Aldo Angelo Moreira Lima  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
(Orientador)

---

Prof. Dra. Ila Fernanda Nunes Lima  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Ana Karoline Costa Ribeiro  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

---

Prof. Dra. Paula Prazeres Magalhães  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

À Cecília.

## AGRADECIMENTOS

O mérito da conclusão desse trabalho não é exclusivo e isso muito me alegra. A meu ver, a forma de orquestra, em que cada um exerce sua aptidão da melhor forma possível, é a expressão máxima da capacidade (solidária) humana.

Primeiramente, agradeço ao meu marido por toda ajuda e compreensão. Toda a dinâmica da casa mudou e quase tudo girou ao redor do objetivo, principalmente na reta final. Vladi, você foi maravilhoso e extremamente compreensivo, muito obrigada;

Agradeço à minha mãe, um exemplo constante de amor e comprometimento; e ao meu irmão e ao meu tio, que sempre me apoiaram;

Agradeço à Dra. Ila Lima, ao Dr. Luís Carlos Rey, ao Dr. Bernhard Weigl e à Fabiana Nascimento que sempre colaboraram com a minha inserção no projeto DEC;

Agradeço à Dra. Rosa Maria Salani Mota que tornou possível que os dados epidemiológicos e laboratoriais se tornassem fonte de referência, discussão e aprimoramento para trabalhos vindouros;

Agradeço ao Dr. Alexandre Havt por seu comprometimento e por ter possibilitado a minha participação em outros trabalhos que muito me motivaram;

Agradeço aos meus queridos colegas Verônica, Eunice, Carminha, Paloma, Mara, Vinícius, Marcos, Marjorie e Pedro Henrique que não podem sequer imaginar a importância do apoio que me deram;

Agradeço ao pessoal do SSGD, Quirino, Júnior e Prof. Alberto, pela constante ajuda;

Agradeço a todo o pessoal da Unidade de Pesquisas Clínicas;

Agradeço ao meu orientador pela inigualável oportunidade e pelos ensinamentos valiosos que foram repassados nesses anos de convivência;

Agradeço às fontes financiadoras: CNPq, PATH/EUA, e Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC);

Agradeço ainda a muitas outras pessoas que encontrei durante essa jornada de formação acadêmica - que vem de longe, eu considero, desde os tempos como técnica no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina da UFMG, passando pelo Centro de Pesquisas René Rachou (como técnica e depois estudante de IC); o ICB/UFMG; o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (recém-graduada) até a Unidade de Pesquisas Clínicas na UFC (na pós-graduação). São vários amigos, os quais, à exemplo do grande Milton Nascimento, eu guardo *“debaixo de sete chaves, dentro do coração”* e nos quais eu ainda hoje busco me espelhar, cada um com sua particularidade, como exemplos de acolhimento, gentileza e generosidade.

Eu tenho muita sorte por ter convivido com cada um de vocês: Clari Gandra, Ana Beatriz Queiroz, Eliandra Soares e Profs./Drs. Olindo Assis Martins- Filho, Andrea Teixeira, Rodrigo Correa-Oliveira, Guilherme C. de Oliveira, Diana Taboada, Iramaya Caldas, Luciana Zuccherato, Josiane Costa, Juliana Estanislau, Roberta Rocha, Danielle Vitelli, Danielle

Brustolim, Edilberto Mendes, Patty Saldanha, Reinaldo Oriá, Ricardo Fujiwara, André Vale,  
Rodolfo Giunchetti, Alexandre Reis e Odair Genaro (*in memorian*).

E, com muito carinho, agradeço às crianças, que merecem atenção, cuidado e dedicação  
constantes.

*“As adversidades e os desafios que a vida nos apresenta carregam a força motriz desencadeadora das transformações necessárias para o bem-estar da humanidade.”*

(Dra. Sílvia Regina Brandalise, 2013)



## RESUMO

*Campylobacter* sp. é uma importante causa de enterite de origem alimentar com alta incidência na população infantil de países em desenvolvimento. No entanto, o diagnóstico específico de sua etiologia segue como um desafio, visto que métodos moleculares e imunoenzimáticos têm se mostrado mais sensíveis. Postulamos que o conhecimento de sua virulência e o diagnóstico específico possam ajudar na identificação e potencial controle da campilobacteriose na infância. Foi determinada a etiologia de diarreia por *Campylobacter* sp., em um estudo transversal sobre diarreia em crianças de 0-36 meses residentes da área urbana de Fortaleza, Ceará, Brasil, que necessitaram de atendimento médico de urgência por causa de doença diarreica. Após a aprovação ética do estudo, um questionário foi aplicado para qualificar as condições clínicas apresentadas por cada criança no momento da admissão. O DNA foi extraído diretamente de amostras fecais coletadas de 226 crianças. Para a detecção do agente etiológico, utilizamos diagnóstico molecular (PCR e RT-PCR) e diagnóstico imunoenzimático (ELISA), além da detecção de genes associados à virulência de *C. jejuni* (PCR). *Campylobacter* sp. foi encontrado em 8,9% (20/225) das amostras, por diagnóstico microbiológico convencional. *C. jejuni* e *C. coli* foram detectados em 19,5% (44/226) e 1,3% (3/226) das amostras diarreicas, respectivamente, por PCR. Os diagnósticos por RT-PCR e ELISA alcançaram 26,7% (60/225) e 37,9% (58/153), respectivamente. Quando considerada a combinação de diagnósticos (positividade no diagnóstico microbiológico ou no imunoenzimático e ao menos em um dos testes moleculares) a prevalência encontrada foi de 16,4% (37/226). A concordância entre os testes para diagnóstico utilizados foi de moderada a regular, de acordo com o índice de Kappa. Genes associados à virulência foram detectados nas seguintes proporções de amostras positivas para *C. jejuni*: *flaA*, 79,5% (35/44); *racR*, 97,7% (43/44) e *dnaJ*, 88,6% (39/44) – relacionados à adesão bacteriana e colonização; *ciaB*, 97,7% (43/44); *pldA*, 45,4% (20/44) e *pVir* 0% (0/44) – relacionados à invasão; e *cdtABC* em 95,4% (42/44) das amostras, operon relacionado à produção da toxina citolética distensora (CDT). Sinais e sintomas específicos, tais como sangue nas fezes, vômito, febre e/ou dor abdominal, apesar de bastante frequentes, não foram associados com a detecção de *C. jejuni*. O perfil de distribuição dos genes de virulência de *C. jejuni* não apresentou correlação com a apresentação clínica da doença, mesmo quando tal perfil foi categorizado de acordo com a função das proteínas codificadas pelos genes, o que nos leva a crer que outros fatores, talvez relacionados à susceptibilidade do hospedeiro, possam ser mais importantes do que a variabilidade genética do micro-organismo. Concluímos que *Campylobacter* sp. foi detectado em percentual relevante da população estudada, principalmente quando os métodos diagnósticos foram utilizados de forma combinada. Em geral, os genes de virulência foram detectados em uma alta proporção das amostras positivas para *C. jejuni*, embora os genes relacionados à invasão tenham sido menos frequentemente encontrados. Corroboramos dados de outros grupos sobre a necessidade de revisão do diagnóstico para *Campylobacter* sp. em prol da inclusão de metodologias mais sensíveis e espécie-específicas, além da busca por marcadores para inflamação intestinal e fatores preditivos de cultura negativa.

**Palavras-chave:** Diarreia Infantil. *Campylobacter*. Virulência. Diagnóstico.

## ABSTRACT

*Campylobacter* sp. is an important cause of food-borne gastroenteritis with high incidence in children living in developing countries. However, the specific diagnosis of its etiology remains as a challenge, since conventional diagnosis by culture is now challenged by molecular and immunoenzymatic methods, which have greater sensitivity. We postulate that the knowledge of its virulence and specific diagnosis may assist in identifying and potentially controlling campylobacteriosis in childhood. We determined the etiology of *Campylobacter* sp. associated diarrhea, in a cross-sectional study of diarrhea in children aged 0-36 months from the urban area of Fortaleza, Ceará, Brazil, who required emergency medical care because of diarrheal disease. After ethical approval of the study, a questionnaire was applied to describe the clinical conditions presented by each child at the time of admission. DNA was extracted directly from fecal samples collected from 226 children. For the determination of the etiologic agent we used molecular diagnostics (PCR and RT-PCR) and diagnostic immunoassay (ELISA), besides the detection of virulence associated genes of *C. jejuni* (PCR). *Campylobacter* sp. was found in 8.9% (20/225) of the samples by conventional microbiological diagnosis. *C. jejuni* and *C. coli* were detected in 19.5% (44/226) and 1.3% (3/226) of the diarrheic samples, respectively. The diagnostic RT-PCR and ELISA reached 26.7% (60/225) and 37.9% (58/153) of positivity, respectively. When considering the combination of diagnostic (positive in microbiological diagnosis or immunoassay and at least one of the molecular tests) the prevalence was 16.4% (37/226). The agreement between the tests used for diagnosis was moderate to regular, according to Kappa index. The presence of *C. jejuni*'s virulence-associated genes that encode proteins related to the pathogenesis of micro-organism were detected in the following proportions of *C. jejuni*-positive DNA samples: *flaA*, 79.5% (35/44); *racR*, 97.7% (43/44) and *dnaJ*, 88.6% (39/44) – related to bacterial adhesion and colonization; *ciaB*, 97.7 % (43/44); *pldA*, 45.4% (20/44) and *pVir* 0% (0/44) – related to invasion, and *cdtABC* in 95.4% (42/44) of samples related to cytotoxic distending toxin (CDT). Specific signs and symptoms such as blood in the stool, vomiting, fever and/or abdominal pain, although quite frequent, were not associated with the detection of *C. jejuni*. The distribution profile of *C. jejuni*'s virulence genes was not correlated with the clinical presentation of the disease, even when this profile was categorized according to the function of the proteins encoded by the genes, which leads us to believe that other factors, perhaps related to host susceptibility, may be more important than genetic variability of the microorganism. We conclude that *Campylobacter* sp. was detected in a significant percentage of the children 0-36 months with diarrhea, especially when the diagnostic methods were used in combination. In general, the virulence genes were detected in a high proportion of *C. jejuni*-positive samples, although the invasion-related genes have been found less frequently. Our data corroborates findings from other groups on the need to revise the diagnostic for *Campylobacter* sp. towards the inclusion of more sensitive and species-specific methods, as well as search for extra markers for intestinal inflammation and predictors of negative culture.

**Keywords:** Diarrhea, Infantile. *Campylobacter*. Virulence. Diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Micrografia de transmissão eletrônica de <i>Campylobacter jejuni</i> . .....	19
<b>Figura 2:</b> Principais rotas de infecção humana por espécies do gênero <i>Campylobacter</i> .21	
<b>Figura 3:</b> Estruturas de superfície de <i>Campylobacter jejuni</i> . .....	27
<b>Figura 4:</b> Representação da entrada de CDTB na célula humana. ....	33
<b>Figura 5:</b> Efeito <i>in vitro</i> da incubação com CDT recombinante reconstituída (CjejCDT). .....	34
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática das interações patógeno-hospedeiro nas campilobacteriores.....	53
<b>Figura 7:</b> Localização relativa dos locais de recrutamento das 226 crianças estudadas em Fortaleza, Ceará, Brasil. ....	58
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática dos dados sobre quantidade e qualidade obtidas de DNA genômico extraído a partir de dois diferentes tipos de amostra fecal. ....	72
<b>Figura 9:</b> Foto da amplificação do gene <i>rrs</i> . ....	72
<b>Figura 10:</b> Diagnóstico microbiológico sugestivo de <i>Campylobacter</i> sp.....	74
<b>Figura 11:</b> Foto da amplificação dos genes <i>hipO</i> e <i>ask</i> . ....	76
<b>Figura 12:</b> Foto da amplificação dos genes de virulência de <i>C. jejuni</i> .....	77
<b>Figura 13:</b> Frequência dos parâmetros clínicos relatados nas crianças do estudo que tiveram amostras testadas para a detecção de genes de virulência de <i>C. jejuni</i> . ....	80
<b>Figura 14:</b> Reação de RT-PCR para detecção do gene <i>gyrA</i> de <i>Campylobacter</i> sp.....	81
<b>Figura 15:</b> Perfil da porcentagem dos resultados de ELISA obtidos nas amostras com detecção molecular de <i>C. jejuni/C. coli</i> (por PCR) ou <i>Campylobacter</i> sp. (por RT-PCR).83	
<b>Figura 16:</b> Média das idades das crianças cujas amostras foram testadas quanto à detecção de <i>Campylobacter</i> sp. ....	84
<b>Figura 17:</b> Percentual de positividade encontrado com diferentes métodos de detecção de <i>Campylobacter</i> sp. ....	85

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Fatores de virulência bacterianos envolvidos na patogênese das campilobacterioses.....	31
<b>Quadro 2:</b> Espécies do gênero <i>Campylobacter</i> encontradas no corpo humano. ....	43
<b>Quadro 3:</b> Perfil de especificidade dos iniciadores utilizados no presente estudo.....	66
<b>Quadro 4:</b> Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de DNA fecal com detecção de <i>C. jejuni</i> ( <i>hipO</i> <sup>+</sup> ). ....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Taxas de isolamento de <i>Campylobacter</i> sp.de amostras diarreicas de crianças menores de cinco anos em regiões em desenvolvimento. ....	36
<b>Tabela 2:</b> Risco atribuível de sequelas crônicas pós-infecção por <i>C. jejuni</i> .....	48
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores utilizados nos protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção molecular do controle interno e dos enteropatógenos <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> , assim como as condições de amplificação e tamanhos esperados dos produtos (amplicons). .	64
<b>Tabela 4:</b> Iniciadores utilizados nos protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para os genes de virulência de <i>C. jejuni</i> , assim como as condições de amplificação e tamanhos esperados dos produtos (amplicons).....	65
<b>Tabela 5:</b> Detalhes da população estudada e informações socioeconômicas das 226 crianças atendidas com diarreia em salas de emergência hospitalar em Fortaleza, Ceará, Brasil, durante o período de Maio/2008 a Abril/2009. ....	70
<b>Tabela 6:</b> Patógenos bacterianos identificados pela microbiologia convencional em 225 amostras de fezes diarreicas de crianças atendidas em salas de emergência hospitalar em Fortaleza, Ceará, Brasil, durante o período de Maio/2008 a Abril/2009.....	73
<b>Tabela 7:</b> Frequência dos parâmetros clínicos relatados e dados sobre a doença diarreica das crianças do estudo que tiveram amostras testadas pela análise microbiológica convencional. ....	75
<b>Tabela 8:</b> Distribuição do perfil de positividade para os casos estudados pela utilização de diferentes técnicas para detecção de <i>Campylobacter</i> sp.....	86
<b>Tabela 9:</b> Graus de concordância (índice de Kappa) e percental de discordância encontrados entre os resultados dos testes Microbiologia convencional e ELISA, PCR e RT-PCR. 87	87
<b>Tabela 10:</b> Graus de concordância (índice de Kappa) e percental de discordância encontrados entre os resultados dos testes PCR, ELISA e RT-PCR. ....	88
<b>Tabela 11:</b> Medidas simples de acurácia dos testes ELISA, RT-PCR e PCR em comparação com a cultura microbiológica. ....	89

## LISTA DE SÍMBOLOS

° ' '' : graus, minutos e segundos (localização geográfica)

**κ**: kappa

°C: grau Celsius

CO<sub>2</sub>: gás carbônico

**g**: gramas

**kDa**: Kilodalton

**mm<sup>3</sup>**: milímetros cúbicos

**M**: Molar

**mg**: miligramas

**μg**: microgramas

**mL**: mililitros

**μL**: microlitros

**ng**: nanogramas

**nm**: nanômetros

**p**: probabilidade de estar ocorrendo erro tipo I, estatística (conclusão errônea de que os grupos diferem entre si)

**pb**: pares de bases

**pg**: picogramas

**R\$**: reais, moeda brasileira

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A260/280:** Razão da leitura espectrofotométrica entre as absorbâncias obtidas a 260nm e 280nm.

**AS:** Antisenso (iniciador de PCR sentido antisenso)

**ask:** gene da aspartato quinase de *C. coli*

**API-20E:** Sistema de identificação bioquímica de *Escherichia coli*

**ATCC:** *American Type Collection Culture*

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**CAC:** Centro de Atendimento à Criança

**CDC:** Centro Norte-americano de Controle de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention*) (EUA)

**CDT:** Toxina citoletal distensora (*Cytolethal distending toxin*)

**cdtABC:** gene das porções A, B e C da toxina citoletal distensora de *C. jejuni*, relacionados à produção de toxinas.

**CE:** Ceará

**ceuE:** gene da enteroquelina (*Probable enterochelin uptake periplasmic-binding protein*)

**CFU:** Unidade formadora de colônias (*Colony-forming unity*)

**Cia:** Antígenos invasivos de *Campylobacter* (*Campylobacter invasive antigens*)

**ciaB:** Gene do antígeno de invasão B de *C. jejuni*, relacionado à invasão

**CjejCDT:** Toxina citoletal distensora recombinante

**COMEPE:** Comitê de Ética em Pesquisa da UFC

**CONEP:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

**CPS:** Polissacarídeo capsular

**Cq:** Ciclo para quantificação em RT-PCR (antigo CT, ou, *cycle threshold*)

**CVA:** Meio seletivo para isolamento de *Campylobacter* sp. contendo: Cefoperazona, Vancomicina e Anfotericina B.

**DALY:** Inabilidade ajustada em anos de vida (*Disability-adjusted life year*)

**DATASUS:** Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, Brasil

**DC:** Células dendríticas (*Dendritic cells*)

**DEC:** *Diarrhea Enteric Card*

**DMEM:** Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles Medium*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

***dnaJ*:** Gene da proteína chaperona *dnaJ* de *C. jejuni*, relacionado à adesão/colonização

**ELISA:** Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

**ELISA ProSpect®:** ELISA para detecção de *Campylobacter* sp. (*ELISA ProSpect® Campylobacter Microplate Assay*)

**EUA:** Estados Unidos da América (*United States of America, USA*)

**FIOCRUZ:** Fundação Oswaldo Cruz

***flaA*:** Gene da flagelina de *C. jejuni*, relacionado à adesão/colonização.

**GEMS:** *Global Enteric Multicenter Study*

**HeLa:** Linhagem celular

**HIAS:** Hospital Infantil Albert Sabin

***hipO*:** Gene da hipurato hidrolase de *C. jejuni*

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana

**HS (*E. coli* HS):** Cepa comensal de *Escherichia coli*

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IBISAB:** Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro

**IFN:** Interferon

**Ig:** Imunoglobulina

**IL-:** Interleucina

**INCQS:** Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**INT407:** Linhagem celular de enterócitos

**IPECE:** Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará

**LCR:** Líquido cefalorraquidiano



**LOS:** Lipooligossacarídeos

**MilliQ:** Água ultra-pura

**MLST:** *Multilocus Sequencing Typing*

**MOLT-4:** Linhagem celular de linfoblastos T (ATCC® CRL-1582™)

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information* (EUA)

**NCTC:** *National Collection of Type Cultures*

**NF-κB:** Fator nuclear transcripcional kappa B

**NLRs:** *NOD-like receptors*

**NOD:** *Nucleotide binding oligomerization domain*

**OMS:** Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO)

**PAMP:** Padrões moleculares associados aos patógenos (*Pathogen-associated Molecular Pattern*)

**PCR:** Reação da polimerase em cadeia ou Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

***pldA*:** Gene para fosfolipase A de *C. jejuni*, relacionado à invasão.

**PRR:** Receptores para reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors*)

***pVir*:** Gene plasmidial da proteína de secreção tipo IV de *C. jejuni*, relacionado à invasão

***racR*:** Gene da proteína de resposta termorreguladora (*response regulation protein*) de *C. jejuni*, relacionado à adesão/colonização.

**RLR:** (*RIG-I-like receptors*) Constituem uma família de RNA helicases críticas para a resposta do hospedeiro anti-infecções virais.

**RNA (16Sr RNA):** RNA ribossomal, componente da subunidade 30S de ribossomos procariotos.

**RPMI:** Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640

***rrs*:** Gene controle interno de presença de DNA de coliformes fecais

**RT-PCR:** PCR em tempo real

**S:** Senso (iniciador de PCR sentido senso)

**SGB:** Síndrome de Guillain-Barré

**SMAC:** Sorbitol MacConkey Agar

**SPSS:** *Statistical Package for Social Sciences*

**SSGD:** Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados

**TCLE:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TGI:** Trato Gastrointestinal

**THP-1:** Linhagem celular de monócitos

**TI:** Trato Intestinal

**TLR:** *Toll-like receptor*

**UFC:** Universidade Federal do Ceará

**UV:** Ultravioleta

**VBNC:** Viável não cultivável (do inglês, *Viable But Non-Culturable*)

**WAZ:** Escore-Z Peso-por-idade (*Weight-for-age Z-score*)

**WHZ:** Escore-Z Peso-por-altura (*Weight-for-height Z-score*)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	19
1.1	<i>Campylobacter</i> sp. ....	19
1.2	Patofisiologia das infecções causadas por <i>Campylobacter</i> sp. ....	22
1.3	Fatores de virulência de <i>Campylobacter</i> sp. ....	30
1.4	Epidemiologia das campilobacterioses .....	34
1.5	Características clínicas das infecções causadas por <i>Campylobacter</i> sp. ....	38
1.6	Critérios para diagnóstico das campilobacterioses .....	39
1.7	Tratamento das campilobacterioses .....	40
1.8	Prognóstico das campilobacterioses .....	42
1.9	Complicações raras das campilobacterioses .....	45
1.10	Questões econômicas e ambientais relacionadas às campilobacterioses .....	48
1.11	Perspectivas sobre o estudo de <i>Campylobacter</i> sp. ....	51
2	JUSTIFICATIVA.....	55
3	OBJETIVOS.....	56
3.1	Objetivo geral .....	56
3.2	Objetivos específicos .....	56
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	57
4.1	Ética do estudo.....	57
4.2	Período e local do estudo .....	57
4.3	População estudada.....	58
4.4	Obtenção e acondicionamento de dados epidemiológicos .....	59
4.5	Coleta e processamento das amostras .....	59
4.6	Diagnóstico microbiológico.....	60
4.7	Extração de DNA das cepas controle .....	61
4.8	Reação da polimerase em cadeia (PCR, detecção de <i>C.jejuni/C.coli</i> ).....	62
4.9	PCR em tempo real (RT-PCR, detecção de <i>Campylobacter</i> sp.) .....	67
4.10	ELISA para <i>Campylobacter</i> sp. ....	67

4.11	Acondicionamento e análise estatística dos dados .....	68
5	RESULTADOS.....	69
5.1	População estudada.....	69
5.2	Dados clínicos.....	71
5.3	Dados laboratoriais iniciais.....	71
5.4	Diagnóstico microbiológico.....	73
5.5	Detecção molecular (PCR) de <i>C. jejuni/coli</i> .....	75
5.6	Detecção molecular de genes de virulência de <i>C. jejuni</i> .....	77
5.7	Detecção de <i>Campylobacter</i> sp. por RT-PCR .....	80
5.8	Detecção de <i>Campylobacter</i> sp. por ELISA.....	81
5.9	Inferências sobre os testes utilizados para diagnóstico.....	83
6	DISCUSSÃO.....	90
7	CONCLUSÃO .....	116
	REFERÊNCIAS .....	117
	ANEXOS.....	149
	ANEXO A - CONEP 13.523/2007 (Parecer 366/07) .....	149
	ANEXO B - CEP (HIAS) .....	150
	ANEXO C - TCLE .....	151
	ANEXO D - CEP (CAC).....	154
	ANEXO E – Checklist de Elegibilidade .....	155
	ANEXO F - Questionário (Dados clínicos).....	156
	ANEXO G - III Congresso Brasileiro de Biotecnologia .....	158
	ANEXO H - SOPs Microbiologia (DEC).....	159
	ANEXO I - Dados <i>Cq Campylobacter</i> sp. (RT-PCR).....	163

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Campylobacter* sp.

O gênero *Campylobacter*, pertencente à classe Epsilonproteobacteria, família Campylobacteraceae, foi proposto por Sebald e Véron em 1963 para uma bactéria conhecida inicialmente como “*Vibrio fetus*”; contudo as diferenças bioquímicas e antigênicas marcantes entre os gêneros *Campylobacter* e *Vibrio*, além de diferenças no conteúdo citosina-guanina no DNA, abriram espaço à nova classificação (CDC, 2013a; SKIRROW, 2006; VÉRON; CHATELAIN, 1973).

O gênero *Campylobacter* spp. é constituído por bacilos Gram-negativos curvos, em forma de S ou espiralados, medindo de 0,2 a 0,9 µm de largura e 0,5 a 5 µm de comprimento (**Figura 1**). São muito móveis por flagelação monotríquia ou anfitríquia. A grande maioria das espécies é microaerófila. Além disso, são todas oxidase-positivas e incapazes de fermentar ou oxidar os hidratos de carbono, obtendo sua energia de aminoácidos ou intermediários que não sejam derivados de hidratos de carbono (FERNÁNDEZ, 2008).

**Figura 1:** Micrografia de transmissão eletrônica de *Campylobacter jejuni*.



Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY, 2012.  
Ampliação: x5130.

Atualmente, 24 espécies compõem o gênero *Campylobacter*, sendo *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* os patógenos humanos mais importantes (ON, 2013). Estudos recentes validaram que outras espécies de *Campylobacter* – tais como *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. sputorum* e *C. upsaliensis* – também podem causar

infecções intestinais em humanos, além de infecções em outros sítios (MAN, 2011; ON, 2013).

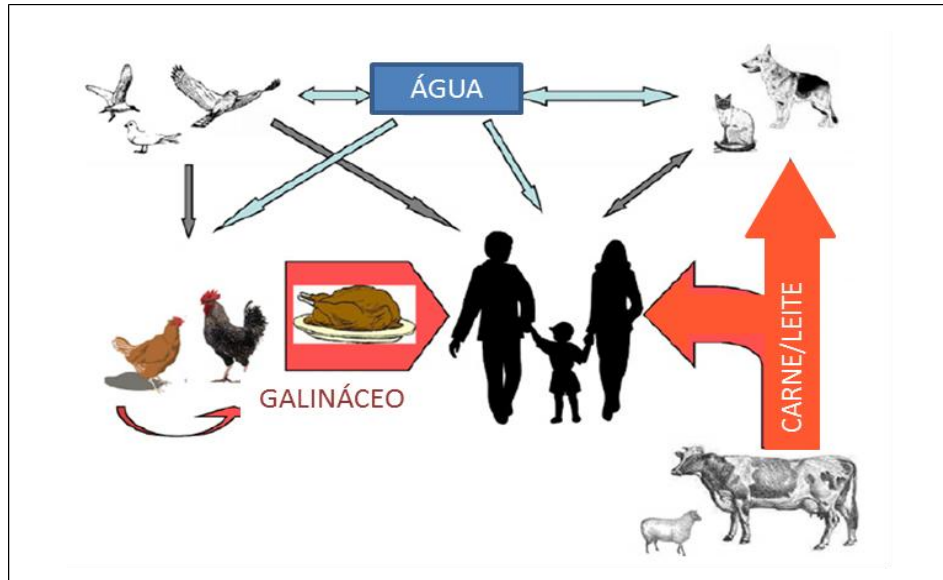
*Campylobacter* sp. é um micro-organismo fastidioso que requer condições microaeróbicas para o crescimento. Assim, os métodos utilizados para a coleta, transporte e cultura podem afetar a sensibilidade do teste clássico de detecção, ou seja, o cultivo microbiológico (HURD *et al.*, 2012).

O gênero *Campylobacter* é ubíquo, coloniza uma ampla variedade de animais de sangue quente, principalmente os galináceos, mas também aves silvestres, bovinos, suínos e animais de estimação, incluindo cães e gatos (KWAN *et al.*, 2008; LEE; NEWELL, 2006; PROCTER *et al.*, 2013; SIEMBIEDA *et al.*, 2011), e, portanto, as campilobacterioses são frequentemente caracterizadas como zoonoses, ou seja, doenças transmitidas aos seres humanos pelos animais ou por produtos de origem animal.

Na maioria das vezes, a carne animal, principalmente frango para consumo humano, se contamina com *Campylobacter* sp. durante o abate, pelo contato com carcaças (DIAS *et al.*, 1990; HABIB *et al.*, 2012; KUANA *et al.*, 2008). A infecção animal raramente é sintomática, mas fornece fontes de contaminação, sendo que a principal via de transmissão é de origem alimentar, através de carne mal cozida e produtos da carne, bem como o consumo de leite cru ou contaminado (HEUVELINK *et al.*, 2009; HOPKINS; OLMSTED; ISTRE, 1984; LONGENBERGER *et al.*, 2013).

A água contaminada também é uma fonte de infecção, relacionada ao aparecimento de surtos (GUBBELS *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2006). Casos de infecção intestinal após o contato com água contaminada durante as atividades recreativas já foram descritos (ROZYNEK *et al.*, 2010), assim como após ingestão acidental de lama em competição esportiva ao ar livre (GRIFFITHS *et al.*, 2010; STUART *et al.*, 2010). A propagação pessoa-a-pessoa já foi relatada, embora em frequência baixa (MUSHER; MUSHER, 2004), e a contaminação via insetos parece também apresentar um papel nas épocas quentes do ano, que contam com a maior incidência de casos (NICHOLS, 2005). A **Figura 2** ilustra as rotas mais importantes para aquisição de campilobacteriose humana.

**Figura 2:** Principais rotas de infecção humana por espécies do gênero *Campylobacter*.



Fonte: DASTI *et al.*, 2010.

Vias de transmissão de *Campylobacter* sp.: A bactéria coloniza o trato gastrointestinal de galináceos, bovinos e outros animais. Pode ocorrer a contaminação de água e alimentos, as fontes mais frequentes de contaminação humana.

Em um ciclo de infecção humana completo, o micro-organismo tem acesso ao trato digestivo via alimentos e, finalmente, é eliminado nas fezes, o que permite a sua transmissão para um novo hospedeiro. O hospedeiro humano não é necessário para a sobrevivência de *Campylobacter* spp. como espécie. Dados apontam que, mais provavelmente, a espécie evoluiu para uma vida comensal, em aves principalmente, e as doenças humanas podem ser consideradas como efeitos colaterais decorrentes de uma interação despropositada entre o hospedeiro humano e a bactéria (THIBODEAU *et al.*, 2013; WASSENAAR, 2011).

As infecções causadas por *Campylobacter* spp. têm sido relatadas como uma das mais frequentes causas de enterites em vários países do mundo (AILES *et al.*, 2012). Desde a década de 70, quando a enterite por *Campylobacter* foi descrita (SKIRROW, 1977), as espécies termotolerantes de *Campylobacter*, principalmente *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, adquiriram grande importância em saúde pública, especialmente como agentes de diarreia infecciosa em humanos (PENNER, 1988).

A infecção experimental humana com *C. jejuni*, realizada por Black *et al.* (1988), demonstrou que 800 organismos são suficientes para causar enterite e que ocorre variação na gravidade dos achados clínicos a depender da cepa utilizada.

Na América Latina, a primeira descrição de enterite associada ao *Campylobacter* sp. ocorreu no Brasil, por Ricciardi *et al.* (1979) que isolaram nove cepas de 186 crianças que apresentavam quadros de diarreia aguda e crônica no Rio de Janeiro.

## **1.2 Patofisiologia das infecções causadas por *Campylobacter* sp.**

O trato gastrointestinal (TGI) é a maior interface entre meio interno de um ser vivo e seu ambiente exterior. Como tal, constitui uma barreira física entre os dois ambientes. No entanto, a função do TGI é mais complexa e não passiva. O TGI não só regula a entrada seletiva de nutrientes, sua absorção, e as funções secretoras, mas também a transmissão de informação para os sistemas imune, vascular e nervoso das mucosas mantendo-se vigilante contra os agentes patogênicos. É também o grande responsável por moldar a resposta imune, pois contém o maior número de células do sistema imunológico (tecido linfóide associado à mucosa, MALT) e a concentração mais elevada de agentes potencialmente patogênicos, antígenos alimentares inofensivos e grandes populações de bactérias comensais. Através de receptores especializados, o TGI não só é capaz de perceber mudanças em seu ambiente, mas também de responder ativamente a essas mudanças, além de orquestrar os eventos da imunidade inata e adquirida (RUEMMELE, 2009).

A barreira intestinal é composta por uma única camada de células epiteliais polarizadas. Bactérias patogênicas podem interagir com a barreira mucosa por secreção de toxinas, transferência de proteínas efetoras em células hospedeiras, invasão das células epiteliais, translocação através da monocamada epitelial, ou pelo rompimento de junções intercelulares. Violações na integridade da barreira epitelial resultam em penetração luminal de micro-organismos ou antígenos, o que estimula respostas pró-inflamatórias relacionadas com o desencadeamento dos sinais e sintomas das doenças intestinais (BELTINGER *et al.*, 2008; RESS *et al.*, 2008; SKJOLAAS *et al.*, 2006).

Além do impedimento físico gerado pelas células da barreira epitelial intestinal, essas mesmas células participam ativamente como sensores imunológicos que reconhecem certos padrões de moléculas de patógenos microbianos e de organismos comensais. As células



hospedeiras são capazes de responder a certos padrões moleculares evolutivamente conservados conhecidos como “Padrões Moleculares Associados aos Patógenos”, ou PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) através de seus “Receptores para Reconhecimento de Padrões”, ou PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), que reconhecem diferentes – e algumas vezes sobrepostos – componentes microbianos, e então, são capazes de ativar vias de sinalização específicas que conduzem à resposta inflamatória específica para cada micro-organismo (SARTOR, 2008).

Dentre os PAMPs podemos destacar certos componentes estruturais altamente conservados dos micro-organismos como alguns lipídeos, lipoproteínas, glicanos e ácidos nucleicos. Dentre os PRRs, expressos em diferentes compartimentos celulares, tais como a superfície da célula, endossoma, lisossomas ou citoplasma, figuram famílias de receptores, como os receptores do tipo *Toll* (*Toll-like receptor*, família TLR); receptores de ligação de domínios oligomerizados de nucleotídeos, os receptores do tipo *NOD* (família NLRs); e receptores do tipo ácido retinóico induzíveis, ou *RIG-I-like* (família RLRs) (MEDZHITOV, 2009).

A família de TLRs detecta PAMPs tanto na superfície celular como no lúmen de vesículas intracelulares como endossomas ou lisossomos. Já as famílias NLRs e RLRs, no geral, são constituídas de uma extensa lista de receptores para PAMPs encontradas apenas no citosol intracelular. O reconhecimento das PAMPs por PRRs desencadeia respostas inatas, incluindo a produção de citocinas inflamatórias, interferon tipo I e a expressão de moléculas coestimuladoras como quimiocinas e inflamossomos (KAWAI; AKIRA, 2009). Os patógenos, no entanto, e quase que por definição, são aqueles micro-organismos que conseguem burlar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Já foi considerado, portanto, que a resposta aos agentes patogênicos não se limita ao reconhecimento das estruturas conservadas como as PAMPs.

Além das PAMPs, é possível que possam ser reconhecidas perturbações no citoesqueleto ou em vias endocíticas causadas pelos micro-organismos e seus fatores de virulência que contribuem para a progressão da doença, uma vez que, tais processos ou eventos poderiam distinguir micro-organismos mais virulentos de outros com reduzido potencial de causar doença. Assim, o hospedeiro poderia se dispor de um leque variável de respostas possíveis, compatíveis com o grau de ataque montado pelos diferentes patógenos (MEDZHITOV, 2011; MEDZHITOV; SCHENEIDER; SOARES, 2012; VANCE; ISBERG; PORTNOY, 2009).

O mecanismo preciso pelo qual *C. jejuni*, um dos mais comuns micro-organismos associados com diarreia infecciosa, interfere no funcionamento da mucosa intestinal permanece indefinido. A escassez de modelos animais e a caracterização antiética em se realizar estudos em voluntários humanos – devido ao mimetismo molecular entre os lipooligosacarídeos (LOS) de *C. jejuni* e os gangliosídeos do hospedeiro humano, que acarreta na possibilidade de geração de anticorpos autoimunes – são fatores limitantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento da doença (DASTI *et al.*, 2010; EDWARDS *et al.*, 2010; ISLAM *et al.*, 2012).

É aceito, no entanto, que o mecanismo de patogênese de *Campylobacter* sp. é composto por pelo menos quatro etapas principais: adesão às células intestinais, colonização do TGI, invasão das células alvo e produção de toxina citoletal distensora (CDT) (HADDAD *et al.*, 2010). Sabe-se ainda que a infecção por *C. jejuni* causa inflamação local aguda, principalmente no intestino delgado. A adesão, a invasão e a produção de CDT por *C. jejuni* constituem passos da infecção por tal micro-organismo que interferem direta ou indiretamente na organização de microtúbulos da célula hospedeira e no aumento da permeabilidade intestinal, que é comprovadamente tempo-dependente e tipo celular-dependente (WINE; CHAN; SHERMAN, 2008).

A adesão bacteriana e a invasão do epitélio intestinal por *C. jejuni* são eventos bem estabelecidos e anteriores ao processo inflamatório e ao desenvolvimento de diarreia. A capacidade de invasão das cepas de *C. jejuni* é frequentemente utilizada como uma medida de sua virulência bacteriana, e essa etapa de invasão depende das características do polissacarídeo capsular e da adaptação das cepas, tanto aos diferentes habitats como na capacidade de escape da resposta imunológica (ZILBAUER *et al.*, 2008).

Os polissacarídeos capsulares são comumente encontrados em superfícies bacterianas e, em geral, desempenham papel na sobrevivência das bactérias e persistência no ambiente, muitas vezes contribuindo para sua disseminação, poder de contaminação e capacidade de escape à resposta imune do hospedeiro (CAMPOS *et al.*, 2004; YOTHER, 2011). Espécies de *Campylobacter* sp., assim como outros patógenos Gram negativos de mucosas, mas diferentemente dos enteropatógenos, expressam uma cápsula polissacarídica (CPS) e lipooligosacarídeos (LOS) de membrana, sendo que ambas as estruturas estão sujeitas a mecanismos de variabilidade que parecem estar relacionados com as diferenças na adaptabilidade e na virulência de cepas distintas (GUERRY *et al.*, 2012, HABIB *et al.*, 2009; KEO *et al.*, 2011; MAUE *et al.*, 2013; STEPHENSON *et al.*, 2013).

A CPS é a principal estrutura determinante do esquema de sorotipagem Penner para *C. jejuni*, sendo que existem 47 sorotipos, número que reflete a diversidade de estruturas de CPS de *C. jejuni* (MAUE *et al.*, 2013; PIKE; GUERRY; POLY, 2013).

Como exemplos dos efeitos resultantes da variação em CPS, temos que a cepa mutante 81-176 *kpsM* de *C. jejuni* – na qual uma mutação determinou a perda de expressão de uma cadeia de glicanos de alto peso molecular, resultando na perda da estrutura capsular – apresentou redução (cerca de 10 vezes) da invasão das células epiteliais intestinais, *in vitro* (BACON *et al.*, 2001). Resultados similares foram obtidos utilizando mutantes não encapsulados de outras cepas (BACHTIAR; COLOE; FRY, 2007; CORCIONIVOSCHI *et al.*, 2009).

Além da variação na composição dos açúcares, a CPS pode ser modificada de outras formas, como por exemplo, a adição de grupamentos como etanolamina, glicerol e O-metil fosforamidato (MeOPN). Tais modificações estão relacionadas à modulação da resposta imune em modelos *in vivo* da infecção (CHAMPION *et al.*, 2010; ROSE *et al.*, 2012).

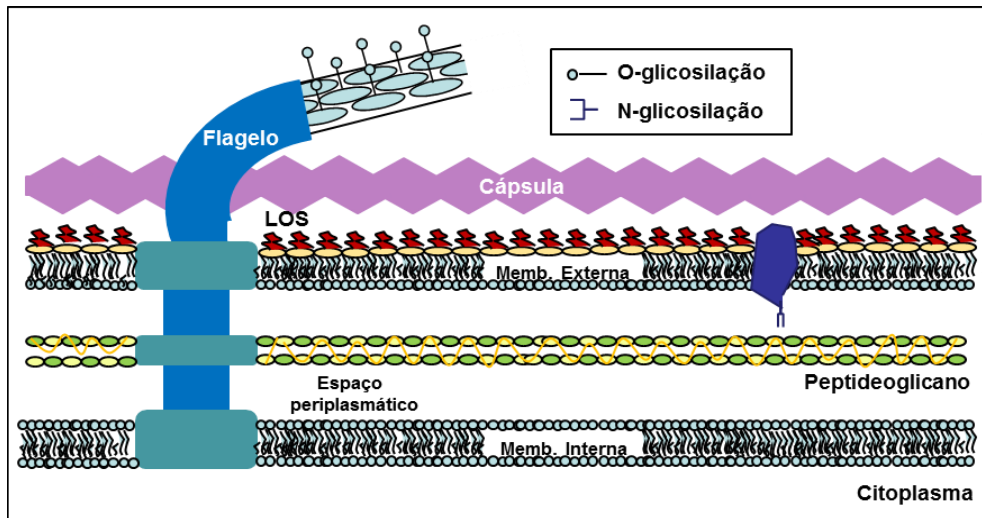
Champion *et al.* (2010), utilizando um modelo de infecção larval (*Galleria mellonella*), demonstraram que as larvas são rapidamente mortas por *C. jejuni* a 37°C. No entanto, ao utilizarem uma cepa mutante sem o grupo lateral capsular de MeOPN, a infecção foi atenuada, demonstrando claramente que MeOPN tem um papel na virulência (CHAMPION *et al.*, 2010).

Já Rose *et al.* (2012), demonstraram que cepas acapsuladas de *C. jejuni* induziram uma produção de citocinas por células dendríticas muito superior à produção desencadeada pela cepa capsulada, evidenciando que a cápsula possui papel na atenuação da resposta do hospedeiro. Ainda, o grupo demonstrou que mesmo pequenas mudanças na composição da cápsula, relacionadas ao grupamento MeOPN, podem levar ao aumento da produção de citocinas (ROSE *et al.*, 2012).

Quanto à capacidade de adaptação de *Campylobacter* sp. aos diversos microambientes, a glicosilação pós-traducional de proteínas vem sendo descrita nesse gênero. A glicosilação é a modificação da cadeia polipeptídica mais abundante na natureza. Glicanos podem ser covalentemente ligados, e, portanto adicionados ao nitrogênio da amida de resíduos asparagina (N-glicosilação), ou ao oxigênio da hidroxila de resíduos de serina ou treonina (O-glicosilação). Atualmente, *C. jejuni* representa um patógeno com uma via de N-glicosilação bem caracterizada, e foi a primeira bactéria para a qual a maquinaria bioquímica de glicosilação foi completamente reconstituída em *E. coli* (WACKER *et al.*, 2002). Mais de 65 proteínas de *C. jejuni*, com diferentes funções, são, comprovadamente, N-glicosiladas.

O potencial dessa variabilidade estrutural (**Figura 3**) pode estar relacionado à capacidade de gerar diversidade antigênica, o que sugere um papel na evasão imune, possivelmente importante na parte aviária do ciclo de vida de *C. jejuni* (SZYMANSKI *et al.*, 2003). Além disso, certo número de cepas de *C. jejuni* e *C. coli* modificam suas proteínas flagelares por O-glicosilação. As modificações de hidratos de carbono resultantes de O-glicosilação pós-traducional em *C. jejuni/coli* geram uma alteração de cerca de 6 kDa a partir da massa molecular calculada das proteínas, o que representa cerca de 10% da massa total das mesmas. Tais modificações são importantes para a montagem do flagelo, a modulação da secreção de proteínas relacionadas à virulência, a colonização bacteriana do trato gastrointestinal, o comportamento de autoaglutinação, a formação de biofilmes e a antigenicidade (NOTHAFT; SZYMANSKI, 2010).

**Figura 3:** Estruturas de superfície de *Campylobacter jejuni*.



Fonte: YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007.

A superfície celular de *C. jejuni* contém várias estruturas, incluindo polissacarídeos que possuem papel na interação bactéria-hospedeiro. A cápsula possui importância na virulência, aderência às células epiteliais e invasão. Os lipooligosacarídeos (LOS) são muito variáveis e apresentam papel na resistência sorológica, aderência e invasão, além de serem capazes de apresentar um mimetismo molecular com gangliosídeos neuronais do hospedeiro humano. O flagelo é requerido para a colonização, virulência e invasão e age também como aparato secretor de antígenos de invasão. A flagelina é modificada por O-glicosilação e tal alteração é requerida para a montagem flagelar e, conseqüentemente, importante para a motilidade, virulência, aderência e invasão celular. O sistema de N-glicosilação é responsável pela alteração de algumas proteínas periplasmáticas e da membrana externa.

Após a fase inicial de adesão ao epitélio intestinal, *C. jejuni* é capaz de invadir as células epiteliais intestinais humanas. Dois padrões distintos de interação foram demonstrados, e parecem variar dependendo da cepa utilizada, visto que há cepas que não invadem as células epiteliais nem afetam as propriedades da barreira intestinal e, de forma inversa, há cepas cujas interações *in vitro* determinam invasão e destruição celular, evidenciadas pelos achados: queda da resistência transepitelial, inibição das funções absorptivas, rearranjos das proteínas juncionais (*tight junctions*) e liberação de lactato desidrogenase; alterações acompanhadas da liberação da quimiocina interleucina (IL-) 8. Tais alterações estão envolvidas no mecanismo pelo qual *C. jejuni* causa diarreia (BELTINGER *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2006; MACCALLUM; HARDY; EVEREST, 2005).

A resposta do hospedeiro a tal invasão inclui o aumento da expressão, pelas células do epitélio intestinal, de citocinas pró-inflamatórias que são dependentes do fator nuclear kB

(NF- $\kappa$ B) (DORREL; WREN, 2007). Como já mencionado, as células epiteliais intestinais constituem a primeira linha de defesa contra os patógenos bacterianos por expressarem vários TLRs. No entanto, ao contrário da maioria dos patógenos bacterianos entéricos, os componentes da superfície celular de *C. jejuni*, como flagelina e LOS são estimuladores fracos de TLR-5 e TLR-4 (WATSON; GÁLAN, 2005). A ativação de TLR-2 por polissacarídeos de membrana de *C. jejuni*, ao menos em modelos *in vitro*, parece ser necessária para a montagem da resposta imune, marcada pela liberação de IL-6 (FRIIS; KEELAN; TAYLOR, 2009).

Zilbauer *et al.* (2007) hipotetizaram o envolvimento da família de PRRs intracelulares no desencadeamento da resposta imune inata contra *C. jejuni* e demonstraram que, quando as células do epitélio intestinal foram expostas a *C. jejuni* previamente fixado por paraformaldeído, as respostas do hospedeiro foram mínimas e o número de bactérias no espaço intracelular foi marcadamente reduzido. Ainda no mesmo trabalho, pela utilização de RNA de interferência, foi identificado que as proteínas NOD1 agem como o principal PRR para *C. jejuni*, sendo que a supressão de NOD1 resultou em aumento de *C. jejuni* intracelulares 20 horas após a infecção. Tais achados sugerem que NOD1 tenha um papel central no combate à infecção da mucosa intestinal por *C. jejuni* (ZILBAUER *et al.*, 2007).

Em 2010, Li *et al.* descreveram um aumento de expressão gênica do receptor NALP1 (um receptor NOD) na linhagem de aves resistente à infecção por *C. jejuni*, quando comparados com a expressão do mesmo receptor em uma linhagem aviária susceptível, sugerindo um papel de tal sistema de reconhecimento nos padrões de resistência/susceptibilidade à infecção aviária por *C. jejuni* (LI *et al.*, 2010).

Os eventos posteriores à invasão celular por *C. jejuni* correspondem à resposta imune inata e adaptativa contra tal micro-organismo, além das estratégias de escape desenvolvidas pelo mesmo. A secreção de fatores quimioatratantes para células dendríticas pelas células epiteliais (após a adesão/invasão por diferentes isolados clínicos de *C. jejuni*) já vinha sendo explorada como determinante do direcionamento das células relacionadas ao início da resposta imune adaptativa na campilobacteriose (JOHANESEN; DWINELL, 2006). As células dendríticas (do inglês, *dendritic cells*, DC) são células apresentadoras de antígeno especializadas que orquestram a resposta imune inata e adaptativa. A mucosa intestinal contém DC em grande número, que induzem tanto uma imunidade protetiva contra agentes infecciosos como tolerância aos antígenos inócuos, antígenos alimentares e bactérias comensais (RUEMMELE, 2009). Assim, as DC agem como sentinelas críticos que retransmitem a presença microbiana para as células T, instruindo o sistema imune adaptativo

na montagem de uma resposta apropriada capaz de, em um hospedeiro saudável, promover, além da remoção do agente infeccioso, um registro de memória (RESCIGNO; DI SABATINO, 2009).

Um estudo realizado no Reino Unido, também buscando elucidar a resposta imune do hospedeiro após a invasão celular por *C. jejuni*, utilizou um sistema de organocultura *in vitro* (IVOC, do inglês *in-vitro organ culture*) – ou seja, explantes de intestino humano saudáveis posteriormente infectados por *C. jejuni*, que funcionaram como um modelo de infecção experimental *ex-vivo* (EDWARDS *et al.*, 2010). Foi encontrado que, nos explantes infectados por *C. jejuni* ocorreu uma expansão significativa de células Th-17, células Th-1 e células Th-17/Th-1 duplo-positivas. Os autores concluíram ainda que IFN-gamma, IL-22 e IL-17A atuam como mediadores críticos da imunidade do hospedeiro, tanto na fase aguda como na fase efetora da infecção por *C. jejuni*. IFN-gamma e IL-22 exercem potente efeito bactericida, pelo estímulo à produção de beta-defensinas, e possuem também função no reparo tecidual (BEAUREPAIRE; SMYTH; MCKAY, 2009; WOLK *et al.*, 2010; ZILBAUER *et al.*, 2005). A IL-17A agiria, portanto, modulando a invasão de *C. jejuni*, restringindo sua sobrevivência dentro da célula epitelial intestinal (EDWARDS *et al.*, 2010).

Embora tais citocinas possam ser decisivas para a eliminação do enteropatógeno, *C. jejuni* sobrevive dentro das células epiteliais intestinais desviando-se da via endocítica comum, residindo em um compartimento intracelular que, nas células epiteliais intestinais, não se funde com os lisossomas, o que demonstra uma adaptação de *C. jejuni* para sobrevivência no hospedeiro humano (WATSON; GÁLAN, 2008).

Em resumo, *C. jejuni* pode causar um espectro de manifestações clínicas, sendo que, na maioria dos indivíduos saudáveis, a infecção é de curta duração e autolimitada, o que sugere um papel importante da resposta imunológica do hospedeiro, tanto no reconhecimento como na eliminação do micro-organismo. O conhecimento da resposta imune do hospedeiro às campilobacterioses e das estratégias de evasão de *C. jejuni* são pontos ainda não completamente elucidados. Em geral, a infecção em modelos *in vivo* sugere que as estratégias de escape de *C. jejuni* são, em certo grau, ultrapassadas pela geração de uma resposta imune efetiva nos hospedeiros imunocompetentes. O uso de animais com microbiota intestinal alterada e/ou portadores de condições pré-existentes ou ainda deficiências imunológicas pode lançar luz sobre a base molecular da patologia induzida por *C. jejuni* (VAN PUTTEN *et al.*, 2009).

### 1.3 Fatores de virulência de *Campylobacter* sp.

*C. jejuni* expressa vários determinantes potenciais de virulência dos quais os mais bem caracterizados incluem a motilidade mediada por flagelo, adesinas e proteínas que lhe conferem capacidade invasiva (DASTI *et al.*, 2010; ZIPRIN *et al.*, 2001). Uma grande soma de tempo, trabalho e investimento foram requeridos para o sequenciamento do genoma completo da cepa NCTC11168 de *C. jejuni*, o que permitiu a caracterização de seu DNA circular, com aproximadamente 1,6 milhões de pares de bases, e da presença de sequências hipervariáveis que codificam proteínas responsáveis pela biosíntese ou modificação de estruturas de superfície (PARKHILL *et al.*, 2000). Em seguida, foram sequenciadas duas cepas (81-176 e CG8486) isoladas de pacientes com diarreia inflamatória grave, e tais estudos, em conjunto com o trabalho de Fouts *et al.*, forneceram pistas sobre características importantes do gênero *Campylobacter*, como seu metabolismo peculiar e seu leque de proteínas determinantes na montagem ou modificação das estruturas de superfície altamente variáveis como LOS e CPS (FOUTS *et al.*, 2005; HOFREUTER *et al.*, 2006; POLY *et al.*, 2007).

A informação genômica, juntamente com alguns estudos comparativos (DORREL *et al.*, 2001; LEONARD *et al.*, 2004; POLY; THREADGILL; STINTZI, 2004; 2005) revelou ainda um notável grau de diversidade entre os isolados de *C. jejuni*, levando-se à hipótese de que tal diversidade seja, em grande parte, responsável pelas distintas propriedades patogênicas dos diferentes isolados de *C. jejuni* (HOFREUTER *et al.*, 2006). Os isolados clínicos, por sua vez, variam entre si na extensão em que apresentam e/ou expressam certos fatores de virulência (BELTINGER *et al.*, 2008).

Ainda, ao contrário de outras bactérias causadoras de diarreia, *C. jejuni* não apresenta um grande número de fatores de virulência ditos ‘clássicos’ como certas exotoxinas e sistemas de secreção tipo III para injeção de proteínas efetoras em células hospedeiras (THOMPSON; GAYNOR, 2008). Assim, são considerados fatores de virulência representativos na patogênese das campilobacterioses os genes que codificam proteínas envolvidas em etapas como: adaptação ao estresse, motilidade, adesão, invasão e produção da toxina distensora citoletal (CDT – *cytolethal distending toxin*). No **Quadro 1**, estão listados os principais fatores de virulência de *C. jejuni*.



**Quadro 1:** Fatores de virulência bacterianos envolvidos na patogênese das campilobacterioses.

Suposta ação	Proteína bacteriana	Importância
Resposta ao estresse	DnaJ	Resposta ao choque térmico
	RacR	Regulador de sinalização temperatura-dependente
	$\gamma$ -glutamiltanspeptidase	Utilização de glutamina e glutatona como fonte de carbono
Motilidade, adesão e invasão	Flagelina	Mutantes não móveis apresentaram menor aderência e menor capacidade de invasão
	pldA	Fosfolipase de membrana externa envolvida com a invasão de células do hospedeiro
	CiaB	Antígeno de invasão, liberado por aparato de exportação flagelar
Toxina	CdtA, B, C	Subunidades A e C transportam a subunidade B ao núcleo da célula hospedeira. CdtB causa parada do ciclo celular, apoptose e secreção de IL-8

Fonte: Própria autora. Adaptado de: DASTI *et al.*, 2010; ZIPRIN *et al.*, 2001.

*C. jejuni* encontra uma variedade de habitats ambientais que variam desde o intestino de animais e seres humanos, até água livre e superfície de alimentos. A sobrevivência nas diferentes condições que serão encontradas nesses habitats requer uma intrincada rede de mecanismos de adaptação que permitem que esse micro-organismo seja capaz de alternar o uso de diferentes fontes de nutrientes e de suportar alterações de temperatura ou disponibilidade de oxigênio – variações encontradas no intestino dos diferentes hospedeiros (VAN PUTTEN *et al.*, 2009). Os genes que codificam proteínas responsáveis pela resposta ao estresse (gerado pela ubiquidade do gênero) são, portanto, considerados alguns dos genes

relacionados à virulência de *C. jejuni*. Os genes *racR* e *dnaJ* seriam, portanto, importantes para a adaptação de *C. jejuni*, uma vez que são presumivelmente expressos em resposta às variações nas condições encontradas na microbiota intestinal dos hospedeiros, como as diferenças entre as temperaturas corporais de reservatórios e humanos (KONKEL *et al.*, 1998; BRÁS *et al.*, 1999).

Aderência ao epitélio intestinal, invasão e colonização são passos fundamentais para a patogênese da campilobacteriose intestinal por *C. jejuni*. Elementos estruturais como os flagelos de *C. jejuni* têm um papel importante tanto no contato com o epitélio, como na invasão e internalização, parâmetros marcadamente reduzidos em experimentos *in vitro* que se utilizaram de bactérias *C. jejuni* que não possuíam o gene que codifica a flagelina, ou seja, mutantes *flaA*<sup>-</sup> (WASSENAAR, 1997).

Foi observado que a cepa NCTC11168V26 de *C. jejuni*, um colonizador pobre em comparação com os outros isolados de *C. jejuni* em aves, não secretam a proteína Cia, o que sugere que Cia apresenta um papel importante na colonização de aves de corte (BISWAS *et al.*, 2007). O gene *ciaB*, por sua vez, codifica uma proteína de invasão denominada Campylobacter invasion antigen B que confere capacidade invasiva, visto que *C. jejuni* mutantes sem o gene *ciaB* (*ciaB* 'null') mostraram reduzida internalização (KONKEL *et al.*, 1999, 2004; DASTI *et al.*, 2010). Ainda, Siegesmund *et al.* (2004) demonstraram que a infecção por *C. jejuni* selvagem induziu a apoptose de 63% das células da linhagem celular monocítica THP-1, enquanto a infecção com uma cepa mutante, que não secretava CiaB, ocasionou apoptose em apenas 34% dos monócitos de mesma linhagem celular, sugerindo assim, um papel de CiaB na indução de apoptose das células de defesa do hospedeiro (SIEGESMUND *et al.*, 2004).

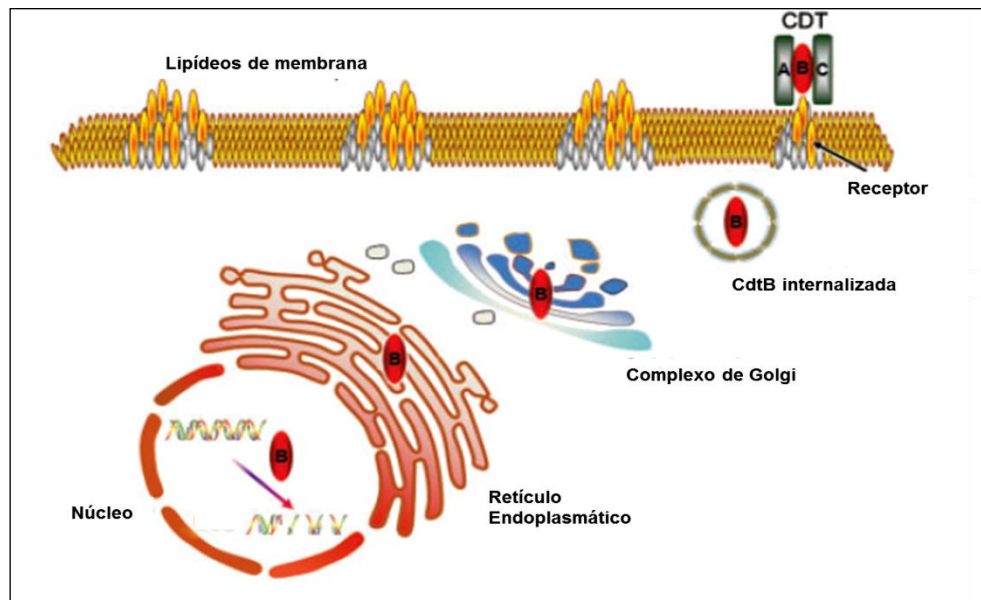
O gene *pldA* codifica uma proteína envolvida na síntese de uma fosfolipase de membrana externa que também tem sido relacionada com a invasão celular (ZIPRIN *et al.*, 2001). Fosfolipases são também associadas com a lise de eritrócitos em alguns agentes patogênicos bacterianos. Mutantes *pldA*<sup>-</sup> demonstraram apresentar atividade hemolítica reduzida em comparação com cepas selvagens (GRANT *et al.*, 1997).

O gene plasmideal *pVir* foi correlacionada com a capacidade do *C. jejuni* de aderência e invasão *in vitro* e parece aumentar a virulência *in vivo* (BACON *et al.*, 2000). Tracz *et al.* (2005) demonstraram que a detecção de *pVir* ocorreu em infecções muito invasivas, com características de disenteria.

Ainda de grande importância, temos a toxina citoletal distensora (do inglês *cytolethal distending toxin*, CDT), uma toxina bacteriana muito eficiente que provoca distensão celular e

morte devido ao bloqueio da divisão celular. Esta toxina é produzida por uma variedade de bactérias Gram-negativas, incluindo *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* e *Haemophilus ducreyi* (YOUNG; SCHAUER, 2000). As subunidades CDTA e CDTC são responsáveis pela ligação aos receptores de membrana em células sensíveis, funcionando, portanto, como portadores da subunidade CDTB, o componente tóxico nuclear que causa o rompimento de DNA dupla fita devido à sua atividade de DNase I (EC 3.1.21.1) (LARA-TEJERO; GALÁN, 2000, 2001; YOUNG; DAVIS; DIRITA, 2007), como esquematizado na **Figura 4**.

**Figura 4:** Representação da entrada de CDTB na célula humana.

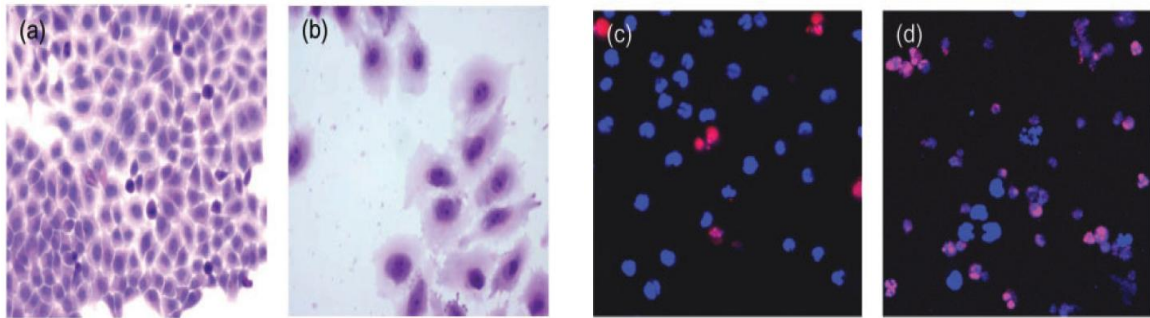


Fonte: JINADASA *et al.*, 2011.

As subunidades CDTA e CDTC da toxina citoletal distensora (CDT) ligam-se aos receptores nas áreas membranares ricas em colesterol, seguindo-se uma rápida endocitose da porção proteica ativa CDTB – com transporte retrógrado via Complexo de Golgi e retículo endoplasmático – e alcance do núcleo, para onde a CDTB é transportada ativamente, causando quebras no DNA de dupla fita.

O efeito final e visualizável da toxina é a alteração da estrutura do citoesqueleto em vários tipos celulares, distensão celular progressiva, bloqueio do ciclo celular na fase G2, e finalmente, a morte celular (GE; SCHAUER; FOX, 2008), como demonstrado no trabalho de Jinadasa *et al.* (2011), do qual foi extraída a **Figura 5**. A CDT, pela sua capacidade de causar apoptose, já foi testada como agente citotóxico para terapia antineoplásica (IWANAGA *et al.*, 2007).

**Figura 5:** Efeito *in vitro* da incubação com CDT recombinante reconstituída (CjejCDT).



Fonte: JINADASA *et al.*, 2011.

(a, b): Microscopia de luz, aumento de 60X, coloração hematoxilina-eosina. (a) Células HeLa incubadas com meio de cultura (DMEM) por 72 h (controle). (b) Células HeLa incubadas com DMEM contendo 25 µg/mL de CjejCDT por 72 h (tratadas). Ocorreu aumento nuclear e citoplasmático das células tratadas quando comparadas com o controle. (c, d): Fotomicrografias de escaneamento por laser confocal, aumento de 40X, corantes Hoescht e iodeto de propídio. (c) Células MOLT-4 incubadas com meio de cultura (RPMI) por 24 h (controle). (d) Células MOLT-4 incubadas RPMI contendo 100ng/mL de CjejCDT por 24 h (tratadas). Mais de 85% das células tratadas apresentaram alterações apoptóticas – condensação e fragmentação da cromatina nuclear (azul) e captação citoplasmática de iodeto de propídio (rosa). Menos de 5% das células controle apresentaram morte celular (vermelho).

Alguns estudos foram capazes de correlacionar marcadores genéticos de *C. jejuni* com parâmetros clínicos apresentados pelos pacientes. Assim, foram determinadas a participação de: (i) LOS de membrana sializados na parede celular (HABIB *et al.*, 2009; LOUWEN *et al.*, 2008; MORTENSEN *et al.*, 2009); (ii) flagelina O-glicosilada (CHAMPION *et al.*, 2005); e (iii) marcadores metabólicos, como a enzima gama-glutamil-transpeptidase, enteroquelina de absorção (*ceuE*) e fosfolipase A (FEODOROFF *et al.*, 2010; HOFREUTER; NOVIK; GÁLAN, 2008) na ocorrência de diarreia sanguinolenta e/ou diarreia de maior duração/gravidade dos sintomas, ou ainda na ocorrência de eventos autoimunes desencadeados pela infecção.

#### 1.4 Epidemiologia das campilobacterioses

Estudos populacionais na Europa (HELMS; SIMONSEN; MOLBAK, 2006; LASSEN; KAPPERUD, 1984; SOROKIN *et al.*, 2007), Estados Unidos da América (EUA) (KOEHLER *et al.*, 2006), Austrália, Canadá e Nova Zelândia (NELSON; HARRIS, 2011)

demonstraram que a epidemiologia das campilobacterioses apresenta uma distribuição bimodal, com a doença alcançando um pico entre crianças de até 5 anos de idade e outro em jovens de 15 a 29 anos. Estima-se que *C. jejuni/coli* sejam os agentes etiológicos responsáveis por 500.000 casos de doença infecciosa intestinal/ano no Reino Unido (TAM *et al.*, 2012).

Em 2010, a campilobacteriose foi a zoonose mais comumente relatada na União Europeia, correspondendo a um total de 212.064 casos humanos relatados – o que constituiu um aumento de 7% em comparação com os valores reportados em 2009. Tal aumento já vem sendo notificado pelo quinto ano consecutivo (EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM, 2012), dado também relatado especificamente para a diarreia do viajante em pacientes europeus: a proporção de pacientes com diarreia aguda devido à contaminação por *Campylobacter* spp. aumentou de 7% em 2008 para 12% em 2010 (GAUTRET *et al.*, 2012). Nos EUA também foi reportado um aumento de 14% na incidência das campilobacterioses entre 2006-2008 e 2012 (CDC, 2013b).

Nos países desenvolvidos, muitos fatores de risco para a transmissão de *Campylobacter* spp. foram identificados, sendo o preparo e ingestão de carne de frango o mais importante, provavelmente o responsável pelo aumento no número de casos reportados ano após ano. Estudos de tipagem genética vêm demonstrando que cepas isoladas de frango frequentemente estão ligadas aos casos clínicos humanos de enterite por *Campylobacter* sp. (HERMANS *et al.*, 2012).

Representam também fatores de risco para transmissão: ingestão de outros produtos de origem animal, incluindo leite cru, ingestão de água contaminada ou água inadequadamente tratada, contato com animais de fazenda ou animais de estimação e viagem ao exterior, principalmente em pacientes retornando do México, Índia, Peru, República Dominicana e Jamaica (KENDALL *et al.*, 2012). Fatores de proteção incluem o consumo de frango preparado em casa e consumo de frango comprado congelado (GAUTRET *et al.*, 2012; OMS, 2001).

Nos países em desenvolvimento, onde um trabalho de vigilância epidemiológica geralmente não abrange as campilobacterioses, os dados pertinentes geralmente são obtidos por estudos pontuais, que, em geral, apontam para o fato de que infecções intestinais repetidas na população infantil são comuns (GUERRY *et al.*, 2012). Estima-se que 40-60% das crianças com até cinco anos de idade desenvolvam pelo menos uma infecção sintomática que normalmente ocorre durante o primeiro ano de vida, ou seja, a incidência de enterite por *Campylobacter* sp. é estimada em aproximadamente 40.000/100.000 crianças menores de cinco anos de idade (COKER *et al.*, 2002). As taxas de isolamento de *Campylobacter* variam

de 2 a 35% em diferentes regiões do globo (**Tabela 1**). Para fins de comparação, vale ressaltar que a incidência na população geral é de aproximadamente 90 casos/100.000 habitantes (OMS, 2001).

**Tabela 1:** Taxas de isolamento de *Campylobacter* spp. a partir de amostras diarreicas de crianças menores de cinco anos em regiões em desenvolvimento.

<b>Regiões*</b>	<b>Taxa de isolamento (%) (Média ± Desvio Padrão)</b>	<b>Mínimo (%) Máximo (%) (País)</b>
África	14,3± 3,5	7,7 (Camarões) 18,0 (Tanzânia)
Américas	11,5± 6,6	2,3 (Colômbia) 30,1 (Argentina)
Mediterrâneo Oriental	8,1 ± 3,8	4,5 (Arábia Saudita) 12,0 (Paquistão)
Sudeste Asiático	15,3± 3,2	13,0 (Tailândia) 17,6 (Bangladesh)
Pacífico Ocidental	11,0± 1,4	4,4 (Lao) 12,0 (Papua Nova Guiné)

Fonte: Própria autora. Adaptado de: OMS, 2001; FERNÁNDEZ, 2011.

\*Países compreendidos nas regiões estudadas: Argélia, Camarões, República Central Africana, Etiópia, Gambia, Nigéria, Tanzania e África do Sul (África); Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Chile, Costa Rica, Equador, Guatemala, México, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (América Central e América do Sul); Arábia Saudita, Egito e Paquistão (Mediterrâneo Oriental); Bangladesh e Tailândia (Sudeste Asiático); China, Lao e Papua Nova Guiné (Pacífico Ocidental).

Em geral, as infecções entéricas sintomáticas por *Campylobacter* spp. afetam em maior proporção as crianças e de forma inversamente proporcional à idade, sendo os menores de dois anos de idade os mais acometidos (COKER *et al.*, 2002; FERNÁNDEZ, 2011; MSHANA *et al.*, 2009; PODEWILS *et al.*, 2004; RAO *et al.*, 2001; SOOFI *et al.*, 2011). A transmissão relatada geralmente ocorre pela ingestão de água contaminada ou diretamente pela via animal-a-homem, devido à higiene precária, situações de aglomeração e contato direto e contínuo com animais (SENOK; BOTTA, 2009). Estudo realizado no estado São Paulo identificou seis subtipos de *C. jejuni*, classificados de acordo com sequenciamento de DNA, compartilhados tanto na infecção humana como na infecção animal (SCARCELLI *et al.*, 2005).

Dados recentes sugerem que as infecções por *Campylobacter* spp. podem ser ainda mais importantes do que se pensava anteriormente. O estudo multicêntrico intitulado GEMS

(*Global Enteric Multicenter Study*), um estudo prospectivo, de diarreia aguda em crianças com 0-59 meses de idade, encontrou em dois anos de acompanhamento dados sobre as infecções por *Campylobacter* sp. na Ásia, demonstrando que as campilobacterioses são importantes infecções entéricas na Índia, Bangladesh e Paquistão, levando ao desencadeamento de diarreia moderada a grave nos primeiros três anos de vida (GUERRY *et al.*, 2012; KOTLOFF *et al.*, 2013). Os autores ainda apontaram que *C. jejuni* foi mais frequentemente diagnosticado do que *Shigella*, embora *Shigella* tenha sido associada com disenteria (GUERRY *et al.*, 2012). Um estudo em Karachi, no Paquistão, relatou uma incidência anual de infecção por *C. jejuni* de 29 por 1.000 pessoas/ano, com pico de incidência por volta dos dois anos de idade (SOOFI *et al.*, 2011).

Apesar das altas taxas de isolamento reportadas, uma estimativa definitiva sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. em países em desenvolvimento ainda não se concretizou porque a infraestrutura da maioria dos laboratórios é inadequada nesses países, e, mesmo quando são aceitáveis, geralmente ocorre uma dificuldade de acesso da população aos serviços de saúde, o que culmina em um quadro de vigilância muito limitado ou inexistente (OMS, 2001).

Outro fator, somente descrito em países em desenvolvimento, contribui com a dificuldade em se estabelecer uma estimativa precisa sobre a ocorrência de *Campylobacter*: o contato frequente com fontes de infecção torna comum a ocorrência de infecções subclínicas e reinfecções assintomáticas nesses países, acarretando na existência de portadores assintomáticos ou “saudáveis” que contribuem com a manutenção do grau de endemicidade do patógeno (GLASS *et al.*, 1983; MOLBACK; HOJLYNG; GAARSLEV, 1988; PLATTS-MILLS; OPERARIO; HOUP, 2012). Ou seja, nos países em desenvolvimento a infecção é hiperendêmica, predominantemente restrita às crianças, sendo relatada ainda a presença de portadores saudáveis do patógeno (COKER *et al.*, 2002). Tal achado fornece evidência de uma possível proteção contra a doença clínica adquirida em indivíduos mais velhos após exposições repetidas (HAVELAAR *et al.*, 2009; MARTIN *et al.*, 1989; QUINLAN, 2013; SJÖGREN; RUIZ-PALACIOS; KAIJSER, 1989).

No México, um grupo de 179 crianças menores de cinco anos de idade residentes em uma comunidade urbana de baixa renda foi acompanhado por um ano em um estudo coorte para determinar a incidência das campilobacterioses intestinais. Aproximadamente 118 crianças (66%) apresentaram pelo menos uma infecção por *Campylobacter* sp., sendo que somente um terço dessas infecções foi associada com diarreia. A incidência anual foi estimada em 2,1 episódios de infecção por *Campylobacter* sp./criança, sendo que tal

incidência foi inversamente relacionada com a idade. Ainda, os pesquisadores sugerem que as infecções que produziram manifestações clínicas foram capazes de proteger as crianças contra infecções posteriores (CALVA *et al.*, 1988).

Na América do Sul, foi reportado o isolamento de espécies de *Campylobacter* dentre crianças sem diarreia, principalmente as desnutridas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008). Em trabalho local, a detecção molecular de *C. jejuni* na área urbana de Fortaleza, Ceará, Brasil, ocorreu em 7,2% das amostras fecais de crianças sem diarreia e 9,6% das crianças com diarreia (QUETZ *et al.*, 2010).

### 1.5 Características clínicas das infecções causadas por *Campylobacter* sp.

A manifestação mais comum da infecção por espécies do gênero *Campylobacter* sp. é a doença diarreica aguda, com diarreia autolimitada, anorexia, mal-estar, cólicas abdominais, e algumas vezes, sangue nas fezes, febre e vômitos. A doença tem duração de dois a cinco dias, podendo, em alguns indivíduos, apresentar sintomas até o décimo dia de infecção (LEHOURS *et al.*, 2012).

A infecção por *C. jejuni* produz um espectro de doenças que varia de diarreia aquosa não inflamatória a enterocolite aguda inflamatória (OMS, 2001).

Embora a base molecular da patogênese da infecção por *C. jejuni* não esteja completamente elucidada, tal micro-organismo pode invadir o epitélio intestinal via microtúbulos e se espalhar pelas células adjacentes de forma basolateral (CHEN *et al.*, 2006). Cepas patogênicas geralmente produzem a toxina CDT que resulta na parada do ciclo celular e dano ao DNA da célula epitelial. A invasão da mucosa pode ainda desencadear a liberação da quimiocina pró-inflamatória IL-8, sendo a mesma quimiotática, provocando influxo de leucócitos polimorfonucleares. Tanto o dano celular induzido por CDT quanto a resposta inflamatória à invasão celular podem deflagrar a diarreia inflamatória (NAVANEETHAN; GIANELLA, 2011).

Experimentos demonstraram que o modo de alastramento basolateral de *C. jejuni* causa rápida queda na resistência transepitelial e comprometimento da barreira epitelial intestinal associada à redistribuição da localização subcelular de proteínas de junção firme, ou seja, as *tight junctions*, como a ocludina-1 (CHEN *et al.*, 2006). Estudo recente avaliou a presença do marcador de inflamação intestinal calprotectina em crianças de três meses a 10 anos de idade que apresentaram diarreia infecciosa em Taiwan, sendo que as crianças com



infecção por *Campylobacter* sp. apresentaram níveis elevados de calprotectina nas fezes (CHEN *et al.*, 2012).

Características relacionadas à inflamação intestinal, como a presença de leucócitos nas fezes e febre, são mais comuns nas infecções por *Campylobacter* sp. em países desenvolvidos (BLASER, 1997). Nos países em desenvolvimento, a infecção sintomática causa, de forma geral, a diarreia aquosa e acomete de forma muito mais predominante as crianças menores de dois anos de idade (COKER *et al.*, 2002; FERNÁNDEZ, 2011; RAO *et al.*, 2001). Em resumo, as infecções intestinais por *Campylobacter* sp. ocorrem mais comumente em países em desenvolvimento, embora a doença clínica tenda a ser mais branda que em países desenvolvidos.

## 1.6 Critérios para diagnóstico das campilobacterioses

A microbiologia convencional de amostra fecal continua sendo o padrão-ouro no diagnóstico de *Campylobacter* spp. em laboratórios clínicos, embora muitos estudos venham reportando repetidamente o baixo rendimento, além do alto custo e a necessidade de grande habilidade técnica para a conclusão da identificação microbiológica de *Campylobacter* sp. (SINGH *et al.*, 2011).

Resumidamente, para este micro-organismo fastidioso, é imperativo garantir um transporte favorável da amostra e as condições de armazenamento apropriadas, incluindo o uso de meios de transporte na fase pré-analítica. Métodos de diagnóstico convencionais exigem que as amostras de fezes sejam cultivadas em ágar seletivo a 42 °C em microaerofilia por até 72 horas antes que um resultado negativo seja emitido (SENOK; BOTTA, 2009).

As placas de cultura com colônias que mostram a morfologia característica de *Campylobacter* spp. e que apresentarem positividade no teste da citocromo-oxidase são reportados como sugestivas de espécies do gênero *Campylobacter*. Posterior identificação da espécie requer ainda outros testes, incluindo preferências de temperatura de crescimento, de sensibilidade aos antibióticos cefalotina e ácido nalidíxico, e testes bioquímicos, principalmente o teste do hipurato. A identificação de *Campylobacter* sp. ao nível de espécie não é realizada pela maioria dos laboratórios de diagnóstico (SENOK; BOTTA, 2009).

Durante o processamento das fezes, as bactérias podem ter contato prolongado com uma atmosfera normal, e, além disso, a diminuição progressiva da tensão de oxigênio, que ocorre quando os kits de geração de microaerofilia são utilizados, podem desfavorecer o

crescimento adequado (BESSÈDE *et al.*, 2011). Como outros agravantes da técnica, temos que *Campylobacter* spp. são inerentemente difíceis de crescer e podem ainda atingir um estado conhecido como ‘viável não-cultivável’ (CAPPELIER *et al.*, 1997; JACKSON *et al.*, 2009; KASSEM; CHANDRASHEKHAR; RAJASHEKARA, 2013; ROLLINS; COLWELL, 1986).

A exposição ao estresse ambiental em várias formas - temperatura, alterações de pH, falta de nutrientes - desencadeia uma resposta que resulta muitas vezes nesse estado denominado ‘viável não-cultivável’ (VBNC, do inglês, *viable but non-culturable*) que é uma capacidade de sobreviver em uma forma potencialmente infectante. A compreensão atual dos processos subjacentes que levam à formação de formas VBNC e, em contrapartida, dos processos que levariam à sua recuperação a partir desse estado de dormência, está longe de ser completa (ON, 2013).

A filtração direta de uma suspensão das fezes, através de filtro de 0,45 µm de diâmetro, colocado sobre a superfície de ágar sangue sem antibióticos e em microaerofilia estrita a 37 °C também permite o isolamento de espécies do gênero *Campylobacter* envolvidas em infecção humana (FERNÁNDEZ, 2008).

O uso de técnicas moleculares de detecção tem sido proposto para estudos epidemiológicos, embora tais testes necessitem de infraestrutura laboratorial adequada além de pessoal devidamente capacitado. Ainda, é necessária a padronização das condições experimentais utilizadas entre os centros que se propõem a instituir tais técnicas como rotina (ABUBAKAR *et al.*, 2007; AJJAMPUR *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2012; ON, 2013; ON *et al.*, 2013).

## **1.7 Tratamento das campilobacterioses**

As enterites por *Campylobacter* sp. geralmente são autolimitadas, dispensando o uso de antimicrobianos. Tal como acontece com todas as doenças diarreicas, a reposição de fluidos e eletrólitos é essencial para o tratamento. Mesmo nos pacientes que necessitam de cuidados médicos para enterite por *Campylobacter* sp., apenas uma pequena parte dos casos se beneficiará da terapia antimicrobiana, recomendada para os quadros graves, prolongados, e também para septicemia e outras complicações, sendo o macrolídeo eritromicina a droga de primeira escolha (BMJ EVIDENCE CENTER, 2012; FERNÁNDEZ, 2008; OMS, 2013a).

As indicações para terapia antimicrobiana incluem os pacientes que apresentam um ou mais dos seguintes sinais: febre alta, diarreia sanguinolenta, mais que oito evacuações em 24 horas, sintomas persistindo por mais de uma semana, bacteremia, pacientes imunocomprometidos e infecção durante a gravidez. Os antimicrobianos não são recomendados em casos não complicados (BMJ EVIDENCE CENTER, 2012; FERNÁNDEZ, 2008; RUIZ-PALACIOS, 2007).

Recentemente, Lee *et al.* reportaram a associação entre infecção por *Campylobacter* sp. e déficit no crescimento linear de crianças peruanas, o que os levou a propor que a tal infecção na população infantil talvez não deva ser considerada uma infecção tão benigna como comumente se assume. Os autores sugerem ainda que seus achados sobre o impacto no desenvolvimento físico dessas crianças possam acarretar em uma possível expansão de indicação de antibioticoterapia na campilobacteriose pediátrica (LEE *et al.*, 2013).

*Campylobacter jejuni* é normalmente sensível aos macrolídeos, quinolonas e tetraciclina. Os macrolídeos geralmente constituem o tratamento de escolha em crianças e adultos, e azitromicina é o preferido devido à conveniência da dose única (BMJ EVIDENCE CENTER, 2012). Eritromicina é a droga de escolha na gravidez. Para adultos, as fluoroquinolonas (sendo ciprofloxacina a droga de escolha) são também utilizadas, visto que são altamente ativas contra espécies de *Campylobacter* sp. e outros patógenos entéricos. A resistência aos antimicrobianos, porém, vem sendo observada em *C. jejuni* e requer vigilância (BAE; JEON, 2013; BMJ EVIDENCE CENTER, 2012; PETRI JR., 2005).

Um aumento da resistência às quinolonas e macrolídeos, além de achados de multirresistência, pode levar à reconsideração sobre o uso desses antimicrobianos como drogas de escolha em pacientes com enterite grave quando *Campylobacter* sp. é a causa presumida (GOSH *et al.*, 2013). Contribuem para a resistência o uso persistente de antibióticos em animais de corte, na cadeia produtor-consumidor, e a intensificação da propagação geográfica de cepas resistentes (GONZÁLEZ-HEIN *et al.*, 2013; RUIZ-PALACIOS, 2007; WASSENAAR, 2011; WIMALARATHNA *et al.*, 2013; ZILBAUER *et al.*, 2008).

Nas infecções sistêmicas, além das drogas de primeira escolha, são utilizados aminoglicosídeos, especialmente gentamicina, ou ainda, cloranfenicol, ampicilina ou tetraciclina como agentes terapêuticos, embora amostras resistentes a cloranfenicol, ampicilina e tetraciclina já tenham sido isoladas em diferentes países, o que aponta para um problema grave de resistência aos antimicrobianos a ser enfrentado pelas políticas de saúde

pública (CHAMBERS, 2005; GONZÁLEZ-ABAD; ALONSO-SANZ, 2013; FERNÁNDEZ, 2008).

## 1.8 Prognóstico das campilobacterioses

Nas enterites por *Campylobacter* sp., após contaminação e período de incubação, que varia de 24 a 72 horas, o paciente apresenta cefaléia, febre, mialgias, dor abdominal e diarreia aguda, leve a grave, quadro que pode durar até uma semana (LEHOURS *et al.*, 2012).

Em indivíduos que apresentam alguma doença pré-existente, desnutrição ou comprometimento do sistema imune, podem ocorrer infecções intestinais mais frequentes e não limitadas, infecções extra intestinais, septicemia e infecção oportunista tanto pelas espécies mais frequentes como por outras espécies que não *C. jejuni/C. coli*, inclusive em próteses médicas (ABBAS *et al.*, 2011; AL JAROUSHA; EL JAROU; EL QOUQA, 2011; ARIGANELLO *et al.*, 2013; CARAMELLI *et al.*, 1988; FICA *et al.*, 2012; GONZÁLEZ-ABAD; ALONSO-SANZ, 2013; HARUYAMA *et al.*, 2011; KOWNHAR *et al.*, 2007; LARSEN *et al.*, 2011; MURPHY *et al.*, 2013; VAN DEN BRUELE *et al.*, 2010).

No **Quadro 2**, estão listadas espécies do gênero *Campylobacter* isoladas de diferentes localizações anatômicas humanas.

**Quadro 2:** Espécies do gênero *Campylobacter* encontradas no corpo humano.

<i>Campylobacter</i> spp.	Sítio de detecção ou de isolamento em humanos
<i>C. coli</i>	Sangue, Líquido Cefalorraquidiano (LCR), Fezes, Trato Intestinal (TI).
<i>C. concisus</i>	Abcesso cerebral, Amostras de biópsia duodenal, Fezes, TI, Abcesso peritoneal, Vesícula biliar.
<i>C. curvus</i>	Cavidade oral, Fezes, Abcesso alveolar.
<i>C. fetus</i>	Sangue, LCR, Fezes, Aspirado gástrico, Aspirado subcutâneo, Vagina, Fígado, Pulmões, Pele, Baço, Próteses, Fetos abortados.
<i>C. gracilis</i>	Abcesso cerebral, Cavidade oral, Fezes.
<i>C. hominis</i>	Sangue, Fezes, TI.
<i>C. helveticus</i> , <i>C. insulaenigrae</i> , <i>C. lanienae</i>	Fezes.
<i>C. hyointestinales</i>	Sangue, Fezes.
<i>C. jejuni</i>	Sangue, LCR, Fezes, TI, Vesícula biliar, Biópsia gástrica, Fluido peritoneal, Urina, Pericárdio.
<i>C. lari</i>	Sangue, Fezes, Cavidade oral.
<i>C. mucosalis</i>	Fezes, Cavidade oral.
<i>C. peloridis</i>	Fluido de diálise, Fezes.
<i>C. rectus</i>	Cavidade oral, TI, Abcesso vertebral.
<i>C. showae</i>	Cavidade oral, TI, Fezes, Abcesso intraorbitário.
<i>C. sputorum</i>	Abcessos diversos (axilar, pulmonar, escrotal), Sangue, Fezes.
<i>C. upsaliensis</i>	Sangue, Fezes, Abcesso mamário.
<i>C. ureolyticus</i>	Líquido amniótico, Fezes, TI, Abcesso oral, Abscessos genitais/perianais, Abscessos de tecidos moles, Lesões gangrenosas de membros inferiores, Urina.

Fonte: Própria autora. Adaptado de: MAN, 2011.

Em países em desenvolvimento, temos o relato da associação entre isolamento de *Campylobacter* spp. e desnutrição em crianças. Fernández *et al.* (2008), no Chile, demonstraram que os portadores de *Campylobacter* eram significativamente mais frequentes entre o grupo de crianças desnutridas (31,4%) do que entre o grupo de crianças nutridas (9,9%). As taxas de isolamento de *Campylobacter* sp. também foram maiores entre crianças africanas desnutridas com diarreia (KAKAI *et al.*, 1995; LLOYD-EVANS; DRASAR; TOMKINS, 1983). Além disso, também a partir de estudo com crianças africanas, o comprometimento do funcionamento normal da mucosa intestinal e da imunidade, secundários à desnutrição, foram enunciados como possíveis explicações para o maior risco de bacteremia causada por *C. jejuni* (REED *et al.*, 1996).

Análises mais recentes – advindas de um estudo prospectivo sobre diarreia adquirida na comunidade que incluía 442 crianças de até 72 meses de idade em uma comunidade semirural na Amazônia peruana – demonstraram que a ocorrência de infecções por *Campylobacter* sp., tanto sintomáticas como assintomáticas, foram associadas com o ganho de peso reduzido em períodos de três meses. Além disso, a infecção sintomática foi marginalmente associada com o crescimento linear reduzido em períodos de nove meses e os episódios mais graves de *Campylobacter* sp. foram associados com déficits ainda maiores, tanto no ganho de peso como no crescimento linear (LEE *et al.*, 2013). Os autores sugerem que tais resultados possam categorizar a infecção por *Campylobacter* sp. como uma porta de entrada da criança no ciclo vicioso diarreia-desnutrição, acelerando os impactos negativos sobre o crescimento linear das crianças (KOLLING; WU; GUERRANT, 2012; LEE *et al.*, 2013).

Tais dados apontados por Lee *et al.* (2013) corroboram dados anteriores de nosso grupo, no qual, em um estudo caso-controle de diarreia adquirida na comunidade em área urbana carente da cidade de Fortaleza, demonstramos uma associação entre a detecção molecular de *C. jejuni* e a ocorrência de piores indicadores de desenvolvimento físico – os escores-Z peso-por-idade (WAZ) e peso-por-altura (WHZ) – mesmo em crianças sem diarreia (QUETZ *et al.*, 2010).

A direção para a qual tais estudos vêm apontando, tendo em conta os conhecidos efeitos de rompimento da barreira intestinal na infecção por *Campylobacter* sp. (BELTINGER *et al.*, 2008), é a de que as campilobacterioses possivelmente contribuem como um importante fator relacionado à desnutrição e suas conseqüências para o desenvolvimento infantil (GUPTA *et al.*, 2011; KOLLING; WU; GUERRANT, 2012).

A determinação dessa contribuição pode ser esclarecida no estudo multicêntrico intitulado “Etiologia, fatores de risco e interações das infecções entéricas e desnutrição e suas conseqüências no desenvolvimento e saúde da criança”, envolvendo uma rede de oito sítios – sendo Fortaleza, Ceará, Brasil um deles (MAL-ED, 2012) – que vem explorando os fatores associados ao risco de uma criança apresentar infecção entérica, diarreia crônica, desnutrição, bem como prejuízo da função intestinal e desenvolvimento físico (GUERRY *et al.*, 2012; KOSEK *et al.*, 2013).

Outra hipótese seria a de que a desnutrição *per se* possa representar um risco para abrigar *Campylobacter* sp. e, ainda, que tal gênero bacteriano possa ser caracterizado, no contexto das deficiências nutricionais, como um patógeno oportunista – caracterização já realizada em países desenvolvidos em outros contextos, como no tratamento oncológico

(GRADEL *et al.*, 2009b) e na imunodeficiência relacionada à infecção por HIV e outras doenças de base (ESMERALDA; MEDINA ÂNGULO, 2013; FERNÁNDEZ-CRUZ *et al.*, 2010; LARSEN *et al.*, 2011).

## 1.9 Complicações raras das campilobacterioses

Com relação à *C. jejuni*, em alguns casos foram relatadas complicações intestinais como quadros de apendicite, megacólon tóxico e colecistite (FERNÁNDEZ, 2008). Houve também relatos de peritonite por *Campylobacter* sp. como complicação de diálise peritoneal ambulatorial continuada (ELSHAFIE *et al.*, 2010; WOOD *et al.*, 1992).

Dentre as sequelas pós-infecciosas relacionadas à *C. jejuni*, que embora raramente se manifestem, são destacadas as síndromes de Guillain-Barré (SGB) e a de Miller Fisher – variedade oftalmológica da SGB (MORI; KUBAWARA; YUKI, 2012; NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE, 2011a, 2011b; YUKI; HARTUNG, 2012).

A SGB é uma polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda na qual o mimetismo molecular entre antígenos de glicolípídeos de um agente infeccioso com gangliosídeos da inervação periférica humana – e subsequente desencadeamento de uma resposta imune cruzada – tem sido implicado como pilar da patogênese, pelo menos nos casos de infecção prévia por *C. jejuni* (ANG *et al.*, 2002; WAKERLEY; YUKI, 2013). Fatores de susceptibilidade do hospedeiro, ainda não identificados, parecem contribuir para o desenvolvimento da síndrome, visto que apenas 1/1.000 dos pacientes com enterite por *Campylobacter* sp. desenvolve a síndrome (CARPORALE *et al.*, 2006; NYATI *et al.*, 2010).

A SGB tem sido relatada ora como complicação pós-infecção, ora como complicação pós-vacinal (ISRAELI *et al.*, 2012; WISE *et al.*, 2012). Infecções prévias por diferentes micro-organismos já foram descritas, mas a infecção prévia recente por *C. jejuni* tem sido reportada em aproximadamente 14-32% dos pacientes acometidos, tornando a campilobacteriose a infecção prévia mais fortemente associada com o desencadeamento da SGB (POROPATICH; WALKER; BLACK, 2010; SINHA *et al.*, 2007; YUKI; HARTUNG, 2012).

Em 2011, foi reportado um surto de SGB na região fronteira entre México e EUA, sendo que foi relatada diarreia antecedente em 85% dos casos (21/26) e presença de

anticorpos IgM anti-*C. jejuni* em 61% dos casos testados (11/18). Os pesquisadores, pela avaliação do conjunto das informações laboratoriais e epidemiológicas sobre exposição e avaliação ambiental, sugerem que os casos de SGB em questão resultaram de um grande surto precedente de infecção por *C. jejuni* a partir de água de torneira contaminada na região de San Luís Rio Colorado, México (JACKSON *et al.*, 2013). Tem-se ainda o relato de um aumento da prevalência de sintomas associados com neuropatia periférica em criadores de gado, o que sugere que a SGB possa representar uma doença ocupacional grave e incapacitante (VEGOSEN *et al.*, 2012).

Tal síndrome, que afeta todos os grupos etários com incidência anual de 0,4 a 4 casos/100.000 habitantes/ano, só pode ser demarcada por uma avaliação conjunta dos achados clínicos, laboratoriais (para fins de exclusão de outras condições) e critérios de eletrodiagnóstico do sistema nervoso periférico, visto que o grau de variação das características clínicas é muito grande dentre os pacientes acometidos (VAN DOORN; RUTS; JACOBS, 2008). Em resumo, os critérios clínicos patognomônicos são: presença de fraqueza motora simétrica aguda e variável – que vão desde fraqueza mínima dos pés a total paralisia de todas as extremidades – e diminuição ou desaparecimento de reflexos profundos. A paralisia é ascendente e com déficit neurológico máximo alcançado em até quatro semanas após o início dos sintomas (DIAS-TOSTA; KÜCKELHAUS, 2002). Os músculos respiratórios também podem ser afetados e até um terço dos pacientes necessita de ventilação artificial. Ainda que a recuperação da SGB seja comum, as taxas de mortalidade estão entre 2% e 10%, e aproximadamente 20% dos pacientes apresentam algum grau de incapacitação permanente (DOURADO *et al.*, 2012).

No Brasil, além de SGB ser a causa mais frequente de paralisia flácida aguda com taxa de incidência anual de 0,6 casos/100.000 habitantes (ROCHA *et al.*, 2004), outro dado importante foi apontado por Dias-Tosta e Kückelhaus (2002): nos casos ocorridos na população de 0-15 anos entre 1990 e 1996, apesar da gravidade da doença ser semelhante nas diferentes macrorregiões brasileiras, o desfecho da síndrome é diferente a depender da origem dos casos, sendo assim apontado o desnível existente entre a condição econômica das regiões Sudeste e Nordeste como um fator possivelmente responsável pelas diferentes taxas de mortalidade relacionadas à SGB: 2,8% no Sudeste e 7,9% no Nordeste.

A SGB representa um protótipo de doença pós-campilobacteriose, no entanto, outras complicações pós-infecção por *Campylobacter* sp. relatadas na literatura incluem: artrite reativa (GARG *et al.*, 2008; POPE *et al.*, 2007), doença celíaca (VERDU *et al.*, 2007) e glomerulonefrite (OP DEN WINKEL *et al.*, 2010). Além disso, evidências recentes sugerem



que *C. jejuni* pode violar a barreira intestinal e com isso desencadear uma resposta crônica inflamatória pós-infecciosa na mucosa intestinal de indivíduos susceptíveis, levando a quadros de enterocolite difusa, como Doença de Crohn, colite ulcerativa e Doença do Intestino Inflamado (GRADEL *et al.*, 2009a; JESS *et al.*, 2011; KALISCHUK; BURET, 2010; SPILLER, 2007; THORNLEY; JENKINS; NEAL, 2001). Temos ainda o, recentemente descrito, primeiro caso de Síndrome de Sweet, também denominada dermatose neutrofílica aguda febril, ligada a infecção prévia por *Campylobacter* spp. (PAI *et al.*, 2012).

Todas essas complicações parecem estar relacionadas a fatores genéticos de susceptibilidade do hospedeiro (NIELSEN; STEFFENSEN; EJLERTSEN, 2012) que vem sendo alvo de investigação mais intensa visto que aproximadamente 10% dos pacientes que sofrem de infecção bacteriana intestinal, principalmente os provenientes de países desenvolvidos, relatam eventos reacionais até 10 anos após o evento infeccioso (RIDDLE *et al.*, 2012). Tais pacientes representam uma população clinicamente importante com comorbidade psiquiátrica associada (DUNLOP *et al.*, 2003; MARSHALL *et al.*, 2010; SCHWILLE-KIUNTKE *et al.*, 2011).

Na **Tabela 2**, temos um resumo dos agravos crônicos decorrentes das infecções entéricas por *C. jejuni* que apontam para a importância de políticas de saúde pública voltadas para a vigilância e contenção de tais infecções.

Tabela 2: **Risco atribuível de sequelas crônicas pós-infecção por *C. jejuni*.**

<b>Sequela</b>	<b>Risco atribuível pós-infecção*</b>
Síndrome de Guillain-Barré (SGB)	1/1.000
Artrite reativa	1-5%
Colite ulcerativa / Doença de Crohn	3-4/10.000
Síndrome do cólon irritável	1-10%

Fonte: GUERRY *et al.*, 2012.

\*O risco atribuível pós-infecção considera a diferença absoluta da taxa de sequelas após infecção por *C. jejuni*, em comparação com a taxa de sequelas de uma população não exposta.

### 1.10 Questões econômicas e ambientais relacionadas às campilobacterioses

Embora as manifestações clínicas geralmente sejam auto-resolutivas, o impacto econômico das infecções por *C. jejuni* é estimado em cerca de oito bilhões de dólares por ano, somente nos Estados Unidos da América (EUA) (BUZBY; ROBERTS, 1997) e 1.400 DALYs (do inglês *Disability-Adjusted Life Years*, inabilidade ajustada em anos de vida)/ano na Holanda (HAVELAAR *et al.*, 2000; OMS, 2004).

Tal custo é parcialmente atribuído às graves complicações que podem ocorrer após a infecção por *C. jejuni* como a Síndrome de Guillain-Barré e a artrite reativa (BUZBY; ALLOS; ROBERTS, 1997; BUZBY; ROBERTS, 2009). Em estudo recente, que comparou a quantidade de anos vividos com doenças (do inglês *Years Lived with Disease*) em 1990 e em 2010, foi demonstrado que o impacto causado pela Síndrome de Guillain-Barré relacionada à campilobacteriose progressiva cresceu 35,7% na população mundial nesse intervalo de duas décadas (VOS *et al.*, 2012).

Devido à sua ocorrência generalizada no meio ambiente, a epidemiologia do gênero *Campylobacter* permanece pouco compreendida. É geralmente aceito, no entanto, que os frangos de corte representem um hospedeiro natural para o *C. jejuni*, sendo, portanto vetores primários da transmissão desse agente patogênico para o homem (SAHIN; MORISHITA; ZHANG, 2002; SKELLY; WEINSTEIN, 2003).

Várias fontes potenciais e vetores de transmissão de *C. jejuni* para frangos de corte têm sido identificados. Inicialmente, alguns galináceos podem ser colonizados com uma idade inferior a duas semanas, e assim a infecção pode se espalhar rapidamente por toda a granja, ou grande parte de seus animais. As aves de abate infectadas transportam uma carga muito elevada de *C. jejuni* em seu trato intestinal, em especial o ceco. Isso acaba por resultar em carcaças contaminadas durante o processamento, que podem transmitir essa bactéria para os seres humanos (HERMANS *et al.*, 2012; ONO; YAMAMOTO, 1999; POTTER; KANEENE; GARDINER, 2002).

Estudos de tipagem genética demonstraram que isolados bacterianos de frango são frequentemente associados aos casos clínicos humanos de enterite por *Campylobacter* sp. A infecção por *Campylobacter* sp. se espalha muito facilmente entre aves de criação que parecem atuar como amplificadores das campilobacterioses. A colonização por *Campylobacter* sp. em granjas varia de 41-59% das aves para corte (GALANIS, 2007). No Brasil, Kuana *et al.* (2008) encontraram *Campylobacter* sp. em cerca de 80% das amostras pesquisadas, tendo sido identificadas como *C. jejuni* (majoritariamente), *C. coli*, *C. upsaliensis* e *C. fetus*.

Apesar da evidência crescente de que o reservatório frango é o fator de risco mais importante para a doença em seres humanos, não existe estratégia eficaz para reduzir a prevalência de *Campylobacter* sp. em granjas e locais de abate de aves, o que pode em parte ser explicado pela compreensão incompleta da epidemiologia da *C. jejuni* em frangos de corte. Como resultado, o número de casos de campilobacteriose humana associados com o vetor frango permanece notavelmente elevado (HERMANS *et al.*, 2012).

A produção de frango para abate em todo mundo aumentou consideravelmente nas últimas décadas e *Campylobacter* sp., principalmente *C.jejuni/C.coli*, podem entrar no meio ambiente quando os resíduos da produção e processamento de aves são descartados. Penas, resíduos de abate e fezes são, em potencial e em geral, altamente contaminados por espécies do gênero *Campylobacter*. Infecção ocupacional em abatedouros já foi relatada (DIAS *et al.*; 1990; PERIO *et al.*, 2013; VEGOSEN *et al.*, 2012). Só no Brasil, em 2011, o abate de frangos chegou a 5,3 bilhões de animais, um aumento de 5,6% em relação a 2010. O peso acumulado das carcaças no primeiro trimestre de 2012 (2,95 milhões de toneladas) foi 6,2% mais alto que no primeiro trimestre de 2011 (IBGE, 2012).

Medidas de controle da infecção animal devem ser tomadas ao longo da cadeia que vai do produtor ao consumidor. Medidas de biossegurança ajudam a diminuir a transmissão entre os animais. Durante o abate, a higiene adequada e a separação de animais infectados e não

infectados diminui o risco de contaminação cruzada. Em alguns países escandinavos, por exemplo, granjas e áreas de processamento com medidas de biossegurança rigorosas foram implantadas, o que gerou um declínio posterior nas taxas de infecção humana por microorganismos do gênero *Campylobacter* (GALANIS, 2007).

O ônus indireto ambiental resultante da produção de aves de corte, portanto, deve ser considerado, pois representa um risco difuso, mas significativo, não só para a contaminação humana, como para a disseminação de cepas resistentes ao tratamento, visto que o uso indiscriminado de antimicrobianos na ração animal gera o potencial de seleção de cepas resistentes em toda a microbiota das aves, incluindo *C. jejuni/coli* (BELANGER; SHRYOCK, 2007; GONZÁLEZ-HEIN *et al.*, 2013; RUIZ-PALACIOS, 2007; WASSENAAR, 2011).

Com relação à contaminação hídrica por espécies de *Campylobacter* spp., o trabalho pioneiro de Lauria-Filgueiras e Hofer (1998) demonstrou a presença de *C. jejuni* e *C. coli* em estações de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro, apontando ainda que tais cepas patogênicas eram isoladas durante a etapa de processamento inicial nessas estações, sendo o tanque de arejamento considerado como uma barreira para a sobrevivência do microorganismo – o que corrobora a importância do tratamento de esgotos, principalmente nas grandes cidades.

Estudo recente sobre a contaminação hídrica com espécies de *Campylobacter* sp., também realizado no estado do Rio de Janeiro, na região da bacia do Rio São João, demonstrou que, dentre 51 amostras coletadas, 21 foram positivas para *Campylobacter* spp., perfazendo um alto percentual de positividade (41,2%) nessa bacia hidrográfica (ESTEVES; FERREIRA; SICILIANO, 2011).

Em 2010, na Holanda, foram avaliados os riscos microbianos associados com a exposição aos patógenos em água contaminada por inundação urbana. *Campylobacter* sp. foi encontrado em todas as amostras de acidentes com inundações de esgoto e os resultados indicaram que a contaminação foi semelhante aos níveis encontrados no esgoto bruto sob condições de alto fluxo (TEN VELDHUIS *et al.*, 2010).

Tais trabalhos, em conjunto, ressaltam a importância da água como poderoso meio de veiculação de espécies de *Campylobacter* sp. – ainda que esse ambiente seja, via de regra, inóspito para a bactéria; e, ao mesmo tempo, alertam sobre o impacto das atividades humanas, como a urbanização, sobre a contaminação dos mananciais de abastecimento, fazendo com que o risco de infecção se perpetue principalmente em áreas onde ocorrem debilidades do esgotamento sanitário e no tratamento de efluentes e ainda quando existir

risco de chuvas fortes e inundações (AULD; MACIVER; KLAASSEN, 2004; RECHENBURG; KISTEMANN, 2009).

### **1.11 Perspectivas sobre o estudo de *Campylobacter* sp.**

*Campylobacter* sp. representa um dos agentes mais comuns de enterite bacteriana tanto para as nações industrializadas como para os países em desenvolvimento. As campilobacterioses permanecem, portanto, como um foco importante para os esforços de pesquisa no intuito de melhorar a prevenção e manejo das infecções. Prioridades para o futuro incluem: a padronização dos métodos diagnósticos (ON, 2013), o entendimento completo da epidemiologia e da ecologia das campilobacterioses que possam ajudar na elaboração de medidas de prevenção efetivas para a população humana; o desenvolvimento de vacinas; o estudo das interações patógeno-hospedeiro e a identificação de fatores de risco para o desenvolvimento de seqüelas pós-infecciosas.

Com relação à prevenção das campilobacterioses, tendo em vista que o consumo de frango é o fator de risco mais importante conhecido atualmente, três estratégias gerais têm sido propostas para controlar *Campylobacter* sp. em aves para abate, a saber: (i) redução da exposição ambiental (com medidas de biossegurança); (ii) aumento na resistência das aves para reduzir a carga de *Campylobacter* sp. transportada no intestino (por exemplo, por exclusão competitiva, vacinação ou seleção genética do hospedeiro), e (iii) a utilização de alternativas antimicrobianas para reduzir ou mesmo eliminar a colonização por *Campylobacter* sp. nas aves (por exemplo, terapia e tratamento de bacteriófagos ou uso de bacteriocina). Com exceção das medidas de biossegurança, as outras duas abordagens de intervenção ainda estão em desenvolvimento (LIN, 2009).

Além disso, têm sido realizados estudos sobre o efeito de processos controlados como a embalagem em atmosfera modificada e o congelamento na sobrevivência de *Campylobacter* sp. em aves pós-abate, tendo sido sugerido que o armazenamento sob condições ricas de oxigênio, assim como o congelamento, reduzem a recuperação desse micro-organismo (BYRD *et al.*, 2011; HAUGHTON *et al.*, 2012; HORROCKS *et al.*, 2009).

Com relação às vacinas, foram realizados testes preliminares com um potencial antígeno vacinal para a redução de *C. jejuni* em frangos de corte. A vacinação das aves com o antígeno escolhido gerou boas respostas sorológicas em comparação com os controles não vacinados sem, no entanto, gerar impacto sobre a colonização cecal. Estes resultados eram de

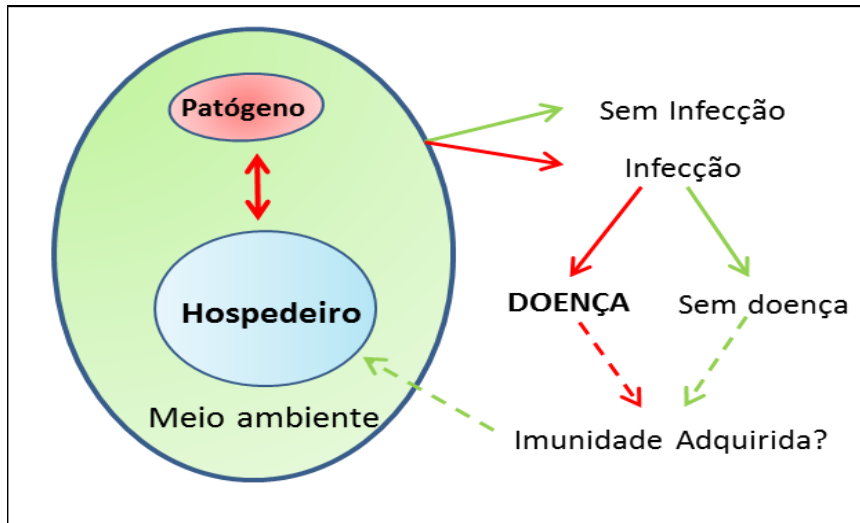
certa forma esperados em aves, especialmente por que a colonização por *Campylobacter* sp. não causa inflamação no trato intestinal dos galináceos, evento que ocasionaria a circulação de anticorpos para o lúmen intestinal. Assim, o desenvolvimento de vacinação oral dispensada em conjunto com vetor recombinante necessita ainda de estudos mais aprofundados (THEORET *et al.*, 2012).

A vacinação para humanos esbarra em dois obstáculos principais que seriam o desenvolvimento de cepas atenuadas eficazes – que atinjam a imunidade celular específica com baixas doses de inóculo – e seguras, visto que o risco de mimetismo dos LOS de *C. jejuni* com gangliosídeos humanos pode gerar sequelas pós-infecciosas como SGB (TRIBBLE *et al.*, 2009; WALKER, 1999). Ainda, a capacidade atual para desenvolver vacinas mucosas eficazes a partir de micro-organismos mortos ou atenuados é inibida pela falta de adjuvantes que sejam seguros e eficazes para os seres humanos (CHIONH *et al.*, 2009). Com isso, as práticas de higiene adequadas, de saneamento e de segurança alimentar constituem as principais medidas de prevenção não só das campilobacterises como de outras infecções entéricas bacterianas (LIMA, 2001).

A amamentação, por sua vez, também atua como um fator de prevenção das campilobacterioses e de várias outras infecções intestinais na infância (BELLIDO-BLASCO *et al.*, 2007). Ruiz-Palacios *et al.* (2003), definiram que fucosiloligossacarídeos do leite materno humano contribuem para a proteção de crianças contra a infecção por *C. jejuni*, pela inibição da adesão do micro-organismo ao epitélio intestinal. O grupo hipotetizou, portanto, que oligossacarídeos sintéticos podem se tornar uma nova classe de agentes antimicrobianos profiláticos e terapêuticos contra as campilobacterioses (RUIZ-PALACIOS *et al.*, 2003).

Ainda, a conclusão de que, após a exposição ao patógeno, cada indivíduo exibe um grau diferente de susceptibilidade à infecção por *Campylobacter* sp. é extraída de uma gama de observações epidemiológicas. É descrito que nem todas as pessoas expostas a uma dose determinada de *Campylobacter* sp. serão colonizados ou irão desenvolver a doença, o que é devido a uma variedade nas possíveis interações entre tal micro-organismo e o hospedeiro humano (**Figura 6**) (JANSSEN *et al.*, 2008).

**Figura 6:** Representação esquemática das interações patógeno-hospedeiro nas campilobacterioses.



Fonte: JANSSEN *et al.*, 2008.

Encontros entre patógeno e hospedeiro em determinadas condições podem levar ou não à infecção. Os indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos ou vir a desenvolver a doença. A indução de imunidade protetora é ainda uma lacuna do conhecimento sobre as campilobacterioses.

Tais diferenças existentes no quadro de interações patógeno-hospedeiro podem estar associadas com fatores específicos, tais como o conteúdo ou acidez estomacal, por exemplo. Com efeito, a utilização de inibidores da bomba de prótons se mostrou um risco para doença clínica por *Campylobacter* spp. (GARCÍA-RODRIGUEZ; RUIGÓMEZ; PANÉS, 2007). Ainda, fatores relacionados à frequência das exposições e à resposta imune inata e específica podem também desempenhar um papel na determinação da susceptibilidade de um indivíduo à infecção por *Campylobacter* sp. (HAVELAAR *et al.*, 2009; KIRKIPATRICK; TRIBBLE, 2011; QUINLAN, 2013). Polimorfismos genéticos relacionados aos mediadores da resposta imune também foram implicados como possíveis responsáveis pelas variações de susceptibilidade dentre os hospedeiros em algumas populações (NIELSEN; STEFFENSEN; EJLERTSEN, 2012).

Em suma, ainda existem lacunas no conhecimento sobre as circunstâncias sob as quais *Campylobacter* sp. interage com as células hospedeiras e causa diarreia. Mais pesquisas são necessárias para uma compreensão detalhada dessas interações e também para o desenvolvimento de estratégias de intervenção para reduzir a carga da doença associada aos micro-organismos do gênero *Campylobacter* (BACKERT; HOFREUTER, 2013; DORRELL;

WREN, 2007). Ainda, é importante o foco na identificação de proteínas imunorreativas específicas do patógeno que possam servir como candidatos vacinais ou determinantes para virulência (NIELSEN *et al.*, 2012).



## 2 JUSTIFICATIVA

Espécies do gênero *Campylobacter* são importantes enteropatógenos com ampla disseminação devido aos hábitos alimentares e higiênicos, e sua distribuição difere entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento, sendo a população infantil a mais susceptível.

A prevalência da infecção entérica por *Campylobacter* sp. na população infantil residente da área urbana de Fortaleza, Ceará, Brasil ainda encontra-se desconhecida, contudo sabe-se que tem havido atendimento médico de urgência devido à diarreia de causa desconhecida.

Um dos desafios primários nas investigações sobre as campilobacterioses é a dificuldade em se diagnosticar de forma sensível e específica o patógeno. Além disso, a análise das estratégias de virulência de *C. jejuni* é ainda seriamente comprometida pela enorme diversidade entre as cepas circulantes.

Logo, na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, postulou-se que o diagnóstico específico de *Campylobacter* sp. e o conhecimento de sua virulência pudessem ajudar na identificação das espécies circulantes e potencial controle e tratamento da campilobacteriose na população acometida.

O presente estudo vem, portanto, pesquisar a prevalência de espécies de *Campylobacter* sp. por uma combinação de métodos diagnósticos: cultivo microbiológico, reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real (RT-PCR) e método imunoenzimático (ELISA). Ainda, pretendeu-se determinar o perfil de genes de virulência de *C. jejuni* em uma população infantil da área urbana de Fortaleza, averiguando a possibilidade de correlação entre marcadores genéticos encontrados e os parâmetros clínicos apresentados pelas crianças.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente trabalho foi determinar a prevalência de *Campylobacter jejuni* – e de genes de virulência – e de *C. coli* em crianças com diarreia moderada a grave residentes da área urbana de Fortaleza.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a prevalência de *C. jejuni* e/ou *C. coli* na diarreia infantil que necessitou de atendimento médico emergencial em serviços de emergência pediátrica na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil.
- ✓ Delimitar a variabilidade genética de *C. jejuni* em relação à presença de genes de virulência que codificam proteínas relacionadas ao mecanismo de patogênese do micro-organismo, ou seja, relacionadas aos processos de adesão e colonização (*flaA*, *racR*, *dnaJ*), invasão (*ciaB*, *pldA* e *pVir*) e produção de toxinas (*cdtABC*).
- ✓ Avaliar a concordância, especificidade e sensibilidade dos testes moleculares e do teste imunoenzimático quanto à capacidade de rastreabilidade das infecções por *Campylobacter* sp.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Ética do estudo**

O presente estudo faz parte de um projeto intitulado “Avaliação de um teste prático para diagnóstico etiológico das diarreias (DEC) em uma unidade hospitalar de Fortaleza”, aprovado originalmente pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, 13.523/2007 – ANEXO A) e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Albert Sabin (HIAS, 80/06 – ANEXO B).

Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, ANEXO C) foi lido e assinado pelos responsáveis pelas crianças recrutadas para o estudo (crianças que necessitaram de cuidados médicos por causa de um evento de doença diarreica) depois que as mesmas foram admitidas como pacientes das salas de emergência de dois locais de atendimento pediátrico em Fortaleza, Ceará, Brasil: o Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) e o Centro de Assistência à Criança Lúcia de Fátima R. G. Sá (CAC).

Os locais de atendimento ambulatorial, escolhidos para o recrutamento nesse estudo, constituíram-se de unidades de atenção de média (CAC) e alta (HIAS) complexidade com atendimento de demanda espontânea e referenciada, ambas conveniadas ao SUS (DATASUS, 2012a). As aprovações expedidas pelos respectivos comitês de ética em pesquisa de tais unidades encontram-se anexas (ANEXOS B e D).

### **4.2 Período e local do estudo**

Um levantamento foi realizado de maio de 2008 a abril de 2009, para avaliar a presença de patógenos entéricos em crianças que necessitaram de atendimento médico por causa de doença diarreica.

As crianças foram atendidas e recrutadas em dois ambulatórios de atendimento infantil da rede pública de atendimento médico em Fortaleza, a saber, o CAC (localização geo-referenciada: 3°46’S, 38°34’O; Endereço: Rua Guilherme Perdigão, 299) e o HIAS (localização geo-referenciada: 3°45’S, 38°31’O; Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544).

Tomando como referência a localização do Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro/Universidade Federal do Ceará (IBISAB/UFC), a localização relativa dos locais de

recrutamento na cidade de Fortaleza está disposta de forma esquematizada na **Figura 7**. As distâncias entre os locais de atendimento (CAC e HIAS) e o IBISAB são de 3,4 km e 2,8 km, respectivamente.

**Figura 7:** Localização relativa dos locais de recrutamento das 226 crianças estudadas em Fortaleza, Ceará, Brasil.



Fonte: Própria autora. Adaptado de: *Google Earth*, 2013.

IBISAB: Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro (IBISAB/UFC); HIAS: Hospital Infantil Albert Sabin e CAC: Centro de Atendimento à Criança Lúcia F. R. G. Sá. Coordenadas geográficas: 3°46'S, 38°34'O (CAC); 3°45'S, 38°31'O (HIAS) e 3°44'S, 38°33'O (IBISAB/UFC).

### 4.3 População estudada

A capital cearense Fortaleza, cuja população é de 2.452.185 habitantes (IBGE, 2010), sendo considerada a quinta maior metrópole brasileira.

Crianças atendidas com diarreia nos locais de recrutamento e com até 36 meses de idade, residentes da área urbana de Fortaleza, foram recrutadas e, após a obtenção do TCLE dos pais ou responsáveis, tiveram estabelecida a entrada no estudo a partir do preenchimento do critério de inclusão: criança em atendimento ambulatorial de urgência médica por causa de doença diarreica presente. A ocorrência de diarreia foi definida como três ou mais evacuações líquidas, por no mínimo 24 horas (OMS, 2013b). Os critérios de exclusão foram: uso prévio de antibióticos e criança em amamentação.

#### 4.4 Obtenção e acondicionamento de dados epidemiológicos

Uma equipe – composta por uma enfermeira e de, no mínimo, um agente de saúde – participaram das atividades de campo do presente estudo, que incluíram o recrutamento, a aplicação de formulários (para documentação das informações obtidas) e coletas de amostras fecais, segundo procedimentos operacionais padronizados do IBISAB/UFC (detalhes no **Item 4.5**).

No total, para as análises e avaliações do presente estudo, foram incluídas 226 crianças cujos responsáveis buscaram e receberam atendimento ambulatorial para quadro de diarreia nas unidades de atendimento CAC ou HIAS durante o período de Maio/2008 a Abril/2009.

Após obtenção do TCLE assinado pelo responsável legal por cada criança, procedeu-se à aplicação dos questionários pelas equipes coletoras de dados. Tais questionários apresentavam dados sobre critérios de inclusão (*Checklist* de Elegibilidades, ANEXO E) e informações básicas como sexo e data de nascimento das crianças, endereço de residência, data da coleta das fezes e questões sobre o estado clínico da criança, relacionados às manifestações clínicas da doença apresentada: febre, vômito, dor abdominal e sangue nas fezes (ANEXO F). Os questionários foram então levados à dupla digitação e gerenciamento de segurança e confidencialidade pelo Setor de Segurança e Gerenciamento de Dados (SSGD), IBISAB/UFC.

#### 4.5 Coleta e processamento das amostras

Amostras fecais foram coletadas de todas as crianças que participaram do presente estudo. Todas as amostras foram obtidas em frasco coletor estéril ou swab estéril e levadas – em até no máximo 4 horas após a coleta, em condições refrigeradas – ao Laboratório de Microbiologia do IBISAB/UFC. As amostras foram então testadas para a presença de *Campylobacter* sp. e outros enteropatógenos por coprocultura e técnicas de identificação da microbiologia clássica (ver adiante no **Item 4.6**). O restante das amostras foi alíquotado e armazenado sem diluição a -80 °C até o momento da extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit *QIAamp DNA Stool Mini kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) para extração de DNA genômico diretamente a partir do material fecal (alíquotas de 200 mg – definidas por pesagem em balança analítica), de acordo com

instruções do fabricante. Foi utilizada uma incubação da amostra em um tampão de lise a 95 °C ao invés de 70 °C, opção escolhida por aperfeiçoar a extração de DNA genômico de enteropatógenos.

O projeto DEC continha várias amostras coletadas em swab anal (*swab*), o que impediria a extração com aliquotas convencionais de 200mg. Assim, foi realizado um ensaio piloto para a extração de DNA a partir das amostras de swab (ANEXO G). A extração de DNA do material fecal contido nos *swabs* se deu de forma bem similar às instruções regulares do kit *QIAamp DNA Stool Mini kit* (Qiagen), com apenas uma etapa inicial de eluição (incubação breve seguida de homogeneização vigorosa) com metade do volume do tampão de lise requerido para as amostras regulares.

Todas as alíquotas de DNA genômico extraídas (a partir de amostras de fezes ou a partir de amostras de swab) foram avaliadas quanto à quantidade e qualidade por leitura em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. A leitura da absorbância 260 nm fornece a quantidade total de rendimento de ácido nucleico. A razão das leituras 260/280 nm (A260/A280) foi utilizada para verificar a qualidade do DNA obtido de cada amostra. As amostras que obtiveram razão entre 1,7 e 2,0 foram consideradas livres de contaminação (GLASEL, 1995).

Os DNAs obtidos foram mantidos a -20 °C até que os ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados.

#### **4.6 Diagnóstico microbiológico**

As amostras foram testadas para a presença de *Campylobacter* spp. por coprocultura e técnicas de identificação da microbiologia clássica descritas adiante, assim como também para a identificação de outros patógenos bacterianos, a saber: *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella*.

Para o isolamento de *Campylobacter* sp., a amostra fecal foi cultivada em ágar Columbia enriquecido com 5% de sangue de carneiro e *Campylobacter Growth Supplement* (Oxoid, Hampshire, Reino Unido, SR0232). A seletividade do meio foi obtida através da adição, conforme instruções do fabricante, de *Campylobacter Selective Supplement Blaser-Wang* (Oxoid, SR0098), que contém vancomicina, polimixina B, trimetoprima, anfotericina B e cefalotina. A incubação ocorreu na temperatura de 42 °C ± 1 °C por até 72 horas em atmosfera de microaerofilia. A identificação fenotípica sugestiva de *Campylobacter* sp. foi

realizada por suas características morfológicas: crescimento de colônias não hemolíticas, translúcidas ou incolores. A atividade da enzima citocromo-oxidase [E.C. 1.9.3.1] foi testada conforme descrição anterior (QUETZ, 2009), com a utilização do reagente N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Foi também realizada a busca por bacilos Gram-negativos em forma de asa de gaiivota pela microscopia ótica, após esfregaço em lâmina e coloração de Gram com carbolfucsina. O diagnóstico microbiológico foi designado como ‘sugestivo’ ou ‘não sugestivo’ de *Campylobacter* sp.

Para a identificação dos outros enteropatógenos, foram utilizadas técnicas padronizadas de microbiologia, conforme ANEXO H. Resumidamente, as amostras foram semeadas em condições aeróbias à temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas, nos meios: ágar MacConkey, ágar MacConkey Sorbitol (SMAC), ágar Heckton Entérico (HE) e ágar Salmonella-Shigella (SS) (Difco, Sparks, MD, EUA). As colônias obtidas foram testadas para identificação fenotípica e bioquímica (ANEXO H). A identificação de *E. coli* foi realizada pela utilização de API-20E (BioMerieux, Craaponne, França).

#### 4.7 Extração de DNA das cepas controle

O DNA para os controles positivos das reações foram extraídos de *C. jejuni* ATCC 33291 e *C. coli* INCQS 00263 (gentilmente cedido pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), como já detalhado (QUETZ *et al.*, 2010). Resumidamente, após chegada ao Laboratório de Microbiologia do IBISAB/UFC, as cepas liofilizadas foram levadas à ressuspensão em solução tampão fosfato 1X (PBS 1X), conforme instruções dos fornecedores, e então, levadas em condições assépticas para cultivo em meio ágar CVA para *Campylobacter* com suplementos de crescimento apropriados (Oxoid) e identificadas conforme descrito acima no **Item 4.6**.

A extração de DNA a partir de cultura de *C. jejuni* ATCC 33291 foi realizada pelo método de fervura em água. Resumidamente, 2-3 colônias de *C. jejuni* ATCC 33291 foram suspensas em 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada estéril e fervida durante 10 minutos. Após centrifugação (956 x g, 10 minutos), o sobrenadante foi mantido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que os ensaios de PCR foram realizados, sendo o mesmo utilizado como molde positivo para as reações de detecção de *C. jejuni* e de genes de virulência por PCR ou Multiplex PCR.

O DNA de *C. coli* INCQS 00263 cultivado foi extraído com um protocolo modificado utilizando o kit *QIAamp DNA Stool Mini kit* (Qiagen) uma vez que a água em ebulição não é um método eficiente para a extração do DNA de *C. coli* (MOHRAN *et al.*, 1998). O procedimento modificado envolveu uma incubação de 2-3 colônias em 100 µl de uma suspensão de água com o mesmo volume de tampão de lise por 5 minutos a 95 °C, ao invés da incubação com a resina *Inhibitex* fornecida pelo kit (QUETZ, 2009). O produto final dessa extração foi mantido a -20 °C até que os ensaios de PCR foram realizados, sendo o mesmo utilizado como molde positivo para as reações de detecção de *C. coli* por PCR.

O DNA de *Escherichia coli*, cepa comensal HS, utilizado como controle positivo da reação para amplificação do gene *rrs*, foi também extraído pelo método de fervura em água. Ágar MacConkey (Difco) foi utilizado para cultivar *E. coli* HS antes da extração de DNA. O gene *rrs*, um gene de *E. coli* que codifica para a porção 16S de rRNA, foi escolhido como controle interno em todas as amostras de DNA fecal pois tal marcador se encontra presente em todo material em que haja presença de coliformes fecais (BRANDAL *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2002).

#### 4.8 Reação da polimerase em cadeia (PCR, detecção de *C.jejuni/C.coli*)

Os iniciadores das PCR para a detecção de *C. jejuni* e *C. coli* foram utilizados como anteriormente descrito (QUETZ *et al.*, 2010) e seguem listados na **Tabela 3**. Os iniciadores utilizados para a detecção dos genes de virulência de *C. jejuni*, juntamente com as condições de ciclagem estão listados na **Tabela 4**, conforme descrição anterior (QUETZ *et al.*, 2012). Todos os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, Brasil). Tanto as reações de PCR-simples como PCR-Multiplex foram realizadas em duplicata e os resultados foram coincidentes. Cada reação de PCR simples continha 12,5 µL de *GoTaq Green Master Mix* (Promega, Fitchburg, WI, EUA), 200 nM de cada iniciador senso e antisenso e 2,5 µL de DNA molde, sendo o volume final de 25 µL obtido pela adição de água livre de nuclease (Promega). As reações PCR-Multiplex continham 15 µL de Solução Multiplex *Qiagen Master Mix* e “Q”-solução potenciadora (Qiagen), 200 nM de iniciador senso e antisenso e 2,5 µL de DNA molde, sendo também o volume final de 25 µL obtido pela adição de água livre de nuclease (Promega). Em toda bateria de reações, correram um controle positivo (DNA bacteriano em questão) e um controle negativo, (do inglês *no template control*, NTC), no qual



foi adicionado 2,5 µL de água deionizada do tipo *MilliQ* (Millipore – Billerica, MA, EUA) autoclavada.

Ainda, a fim de certificar a qualidade dos procedimentos de extração antes do início da detecção molecular de *C. jejuni* e seus genes de virulência e de *C. coli*, foi realizada uma reação de PCR como controle interno de todo o DNA extraído diretamente de alíquotas fecais. O gene escolhido para controle interno foi *rrs*, pelas razões já descritas anteriormente (BRANDAL *et al*, 2007; WANG *et al*, 2002). As sequências dos iniciadores para detecção do gene *rrs*, assim como as condições de amplificação e tamanho esperado do produto encontram-se na **Tabela 3**.

A visualização de todos os produtos amplificados (amplicons) foi realizada após corrida eletroforética em géis de agarose a 2% ou 4% (para reações PCR-simples ou PCR-Multiplex, respectivamente) corados em solução de brometo de etídio a 1,0 µg/mL conforme descrito previamente (QUETZ, 2009). Os géis foram visualizados no Sistema *ChemiDoc XRS* de transiluminação UV (Bio-Rad, San Diego, CA, EUA).

Os equipamentos utilizados até essa fase da descrição dos métodos, além do leitor de ELISA descrito no **Item 4.10**, são todos pertencentes ao Laboratório de Doenças Infecciosas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro.

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados nos protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção molecular do controle interno e dos enteropatógenos *C. jejuni* e *C. coli*, assim como as condições de amplificação e tamanhos esperados dos produtos (amplicons).

Alvo de detecção	Sequencia dos iniciadores (5'→3')	Acesso ao GenBank, NCBI	Tamanho do amplicon (pb)	Condições de PCR (35 ciclos)	Referências
<b>Controle interno</b>					
<i>rrs</i> <sup>a,c</sup> – <i>E.coli</i> 16SrRNA	S: CCCCTGGACGAAGACTGAC AS: ACCGCTGGCAACAAAGGATA	JN547259.1	401	20'' a 95 °C, 20'' a 63 °C, 45'' a 72 °C	Wang <i>et al</i> , 2002 Brandal <i>et al</i> , 2007
<b><i>C. jejuni</i></b>					
<i>hipO</i> <sup>a,c</sup> – gene para hipuricase de <i>C. jejuni</i>	S: ATGATGGCTTCTTCGGATAG AS: GCTCCTATGCTTACAAGTGC	FJ655194.1	176		
<b><i>C. coli</i></b>					
<i>ask</i> <sup>a,c</sup> – gene para aspartato quinase de <i>C. coli</i>	S: GGTATGATTTCTACAAGCGAG AS: ATAAAAGACTATCGTCGCGTG	AF017758.1	502	20'' a 95 °C, 20'' a 51 °C, 45'' a 72 °C	Quetz <i>et al</i> , 2010

Fonte: Própria autora. Adaptado de Quetz *et al.*, 2010.

Notas: Para todas as condições de PCR, ocorreram adicionalmente um passo para desnaturação inicial (5 minutos a 95 °C) e um passo para extensão final (10 minutos a 72 °C), utilizando termociclador *MyCycler*<sup>TM</sup> (BIO-RAD, San Diego, CA, EUA). S= Iniciador senso; AS = Iniciador anti-senso. <sup>a</sup> Gene cromossomal; <sup>c</sup> PCR comum.

**Tabela 4:** Iniciadores utilizados nos protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para dos genes de virulência de *C. jejuni*, assim como as condições de amplificação e tamanhos esperados dos produtos (amplicons).

Genes de virulência de <i>C. jejuni</i>	Sequencia dos iniciadores (5'→3')	Acesso ao GenBank, NCBI	Amplicon (pb)	Condições de PCR (35 ciclos)	Referência
<i>ciaB</i> <sup>a,d</sup> – <i>Campylobacter</i> invasion antigen B	S: TCATGCGGTGGCATTAGAATGGG AS: AGGTCTAACTTCATCAACCCTTTGCCA	AF114831.1	658		Konkel <i>et al</i> , 1999
<i>dnaJ</i> <sup>a,d</sup> – proteína chaperona DnaJ	S: AGGCTTTGGCTCATCACGTCG AS: GGTCGCTTCACCGCGTATGG	AF053962.1	574	30'' a 95 °C, 30'' a 64 °C, 45'' a 72 °C	Konkel <i>et al</i> , 1998
<i>racR</i> <sup>a,d</sup> – DNA-binding response regulator	S: TGGGGCTTCAAATCGGTGCTGA AS: GCGACCGATGATAACATCAAGGCT	GQ491062.1	326		Hamidian <i>et al</i> , 2011
<i>flaA</i> <sup>a,d</sup> – flagelina	S: AGCTGCTTCGCAACTTTCTACGGT AS: TGCACTCTCGGCTGCAAAGTCT	AF369585.1	325	30'' a 95 °C, 30'' a 59 °C, 45'' a 72 °C	Fitzerald <i>et al</i> , 2001
<i>pldA</i> <sup>a,d</sup> – fosfolipase A	S: AAGAGTGAGGCGAAATTCCA AS: GCAAGATGGCAGGATTATCA	CP000025.1	385	30'' a 95 °C, 30'' a 59 °C, 45'' a 72 °C	Fouts <i>et al</i> , 2005
<i>pVir</i> <sup>b,c</sup> – plasmídeo associado à disenteria	S: GAACAGGAAGTGGAAAACTAGC AS: TTCCGCATTGGGCTATATG	AF226280.2	708	30'' a 95 °C, 30'' a 55 °C, 1' a 72 °C	Bacon <i>et al</i> , 2002
<i>cdtA</i> <sup>a,d</sup> – CDT <sup>1</sup> , porção A	S: TTGGCGATGCTAGAGTTTGG AS: ACCGCTGTATTGCTCATAGGG		175		
<i>cdtB</i> <sup>a,d</sup> – CDT <sup>1</sup> , porção B	S: CTCGCGTTGATGTAGGAGCTA AS: GCAGCTAAAAGCGGTGGAGTA	AY445094.1	418	30'' a 95 °C, 30'' a 56 °C, 45'' a 72 °C	Quetz <i>et al</i> , 2010
<i>cdtC</i> <sup>a,d</sup> – CDT <sup>1</sup> , porção C	S: AGCCTTTGCAACTCCTACTGG AS: GCTCCAAAGGTTCCATCTTC		270		

Fonte: Própria autora. Adaptado de Quetz *et al*, 2012. Notas: Para todas as condições de PCR, ocorreram adicionalmente: um passo para desnaturação inicial a 95 °C (5 min., PCR comum; 15 min., PCR multiplex) e um passo para extensão final (72 °C, 10 min.), utilizando termociclador *MyCycler*<sup>TM</sup> (BIO-RAD, San Diego, CA, EUA). S = Iniciador senso; AS = Iniciador anti-senso. <sup>a</sup> Gene cromossomal; <sup>b</sup> Gene plasmidial; <sup>c</sup> PCR comum, <sup>d</sup> PCR Multiplex. <sup>1</sup>CDT = Toxina Distensora Citoletal (do inglês, *Cytolethal Distending Toxin*).

No **Quadro 03**, encontra-se a especificidade dos iniciadores utilizados, descritos nas **Tabelas 03 e 04** e adiante no **Item 4.9**.

**Quadro 3:** Perfil de especificidade dos iniciadores utilizados no presente estudo.

Iniciadores <sup>❶</sup> p/ detecção de	Número de Acesso <sup>❷</sup> (% de homologia)	
	Cepas com 95-100% de homologia	Cepas com homologia <95%
<i>rrs</i>	Várias cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> . (~100%).	–
<i>hipO</i>	Várias cepas de <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> e <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> (97-100%): NC018709.2; <u>CP00</u> : 3871.2, 1900.1, etc.	–
<i>ask</i>	<i>C. coli</i> (100%): AF017758.1; <i>C. huyoilei</i> (99%): AF017759.1	<i>Helicobacter pylori</i> (~93%): AP011945.1, CP003476.1 e <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> (86%): CP00768.1
<i>dnaJ</i> <i>flaA</i>	Várias cepas de <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> e <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> (95-100%): <i>dnaJ</i> : AF052661.1, AL111168.1, CP00: 0025.1, 1876.1, 1900.1, 1960.1, etc. <i>flaA</i> : AL111168.1; <u>AF0501</u> : 92.1, 97.1; <u>JQ9915</u> : 92.1, 97.1, etc.	Cepas de <i>C. coli</i> (~82%): <i>dnaJ</i> : <u>AB5427</u> : 29.1 e 38.1. <i>flaA</i> : <u>M646</u> : 70.1 e 71.1.
<i>racR</i> <i>ciaB</i> <i>pldA</i>	Várias cepas de <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> e <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> (95-100%): <i>racR</i> : AF053960.1, AL111168.1, <u>CP00</u> : 0538.1, 1960.1, 3871.2, etc. <i>ciaB</i> : AL111168.1, <u>CP00</u> : 0025.1, 0768.1, 0814.1, 1876.1, 1900.1, 3871.2. <i>pldA</i> : <u>CP00</u> : 0025.1, 0768.1, 0814.1; <u>FJ946</u> : 195.1, 199.1; 201.1, etc.	–
<i>pVir</i>	Várias cepas de <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> e <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> (95-100%): CP00: 0768.1, 1877.1; AF226280.2, etc. Plasmídeo <i>pTet</i> (96-100%): CP002030.1, <u>AY</u> : 394561.1, 714214.1.	<i>C. lari</i> (94%): CP00932.1; <i>Helicobacter cinaedi</i> (81%): <u>AP012</u> : 344.1 e 492.1.
<i>cdtABC</i>	Várias cepas de <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> (97-100%): CP003871.2; AB274792.1; AL111168.1; AY445094.1, etc.	<i>cdtABC</i> de <i>C. lari</i> (79%, somente iniciador para <i>cdtB</i> ): <u>AB5093</u> : 47.1, 48.1.
<i>gyrA</i>	<i>C. jejuni</i> : <u>CP003871.2</u> e <u>AY575039.1</u> (100%); e várias cepas de <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> e <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> (98-99%) dentre elas: HE978252.1; <u>CP00</u> : 1876.1; 0768.1; 1900.1; AL111168.1, etc.	Cepas de <i>C. coli</i> (~85%): <u>AY5750</u> : 42.1, 43.1, 44.1, 46.1 e 48.1. E, 76-82% ( <u>CP0000</u> -): <i>C. lari</i> : 932.1; <i>C. hominis</i> : 776.1 e <i>C. fetus</i> : 487.1.

Fonte: Própria autora.

❶ Sequências dos iniciadores, temperaturas de anelamento e tamanho dos produtos obtidos após a amplificação (amplicons) conforme descrição anterior nas **Tabelas 3 e 4** e, adiante, no **Item 4.9** (com relação aos iniciadores para detecção de *gyrA*). ❷ Números de acesso (NCBI, 2013) das sequências que produziram alinhamento significativo com as sequências do alvo principal.

#### 4.9 PCR em tempo real (RT-PCR, detecção de *Campylobacter* sp.)

Após a finalização das coletas, alíquotas do material fecal foram devidamente enviadas para o Programa para Tecnologia Apropriada em Saúde (*Program for Appropriate Technology in Health*, PATH) em Seattle, Washington, EUA. As alíquotas tiveram DNA extraído e foram testadas para a presença de vários genes de enteropatógenos por PCR em tempo real (RT-PCR) baseado na incorporação de *SYBR Green*, dentre eles o gene *gyrA*, para detecção de *Campylobacter* sp.

Os iniciadores para a detecção do gene *gyrA* (GenBank CP003871.2, NCBI, EUA) foram sintetizados pela Micronics (Redmond, WA, EUA); sendo as sequências escolhidas GAGTGTTATTATAGGTCGTGCTTTG (iniciador senso) e CTATAACAGCACCCACTATACGG (iniciador anti-senso); utilizados na concentração final de 400 nM. Após incubações iniciais a 50 °C (2 min.) e 95°C (10 min.), cada ciclo consistiu de uma fase de desnaturação inicial de 15 seg. a 95° C, seguida por uma fase de anelamento de 1 min. a 60 °C e uma fase de extensão de 45 seg. a 72° C. O tamanho do produto obtido era de 146pb. A captação de fluorescência ocorreu a cada ciclo na fase de extensão. Os dados obtidos foram armazenados e analisados no sistema para PCR em tempo real ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foi determinado o ciclo limiar (*threshold cycle*, CT) em que a fluorescência observada foi 10 vezes maior que a fluorescência basal para cada ensaio de RT-qPCR, conforme pormenorizado no ANEXO I. Os resultados foram expressos como amplificação positiva ( $\leq 35$  ciclos), marginal (entre 35 e 40 ciclos) ou negativa ( $> 40$  ciclos).

#### 4.10 ELISA para *Campylobacter* sp.

Com o intuito de dar maior apoio ao ensaio molecular, foi realizado um ensaio imunoenzimático capaz de detectar antígenos de superfície de *C. jejuni/coli*, *Campylobacter ProSpect Microplate Assay* (Remel, Lenexa, KS, EUA). Tal ensaio foi realizado em 59% das amostras e o fator limitante para decisão de realização do ensaio foi a disponibilidade de material fecal (300 mg) remanescente após as extrações de DNA. O ensaio foi realizado em duas baterias contendo 92 amostras/placa, seguindo as orientações do fabricante. As placas

foram lidas com espectrofotômetro *Microplate ELISA Reader* (Bio-Rad) em filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm. Foi avaliado o grau de concordância entre os resultados de PCR, RT-PCR e ELISA.

#### **4.11 Acondicionamento e análise estatística dos dados**

Todos os dados gerados foram codificados em planilha Excel, *MICROSOFT*® (New York, NY, EUA) e adicionados por dois digitadores independentes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *Statistical Package for Social Sciences* versão 18.0 (*SPSS Inc.*™, Chicago, IL, EUA). A análise das associações foi realizada em tabelas de contingência, utilizando o teste exato de Fisher. Para comparação de médias, a normalidade da distribuição dos dados foi previamente verificada. Quando a distribuição normal dos dados foi confirmada, a comparação dos dois meios foi realizada usando teste t de Student; teste ANOVA foi utilizado para comparar três ou mais médias. Sub-hipóteses foram analisados por meio do teste de Bonferroni. Quando a normalidade não foi aceita, a comparação de duas médias foi realizada usando o teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

O índice Kappa foi utilizado para determinar o grau de concordância entre os resultados dos testes moleculares e ELISA. Medidas simples de acurácia para os testes ELISA, PCR e RT-PCR foram realizadas tendo como base prevalência assumida em trabalho anterior correlato (QUETZ, *et al* 2012).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 População estudada

A caracterização de toda a população estudada encontra-se pormenorizada em trabalho anterior do Laboratório de Doenças Infecciosas (QUETZ *et al.*, 2012) e, com relação ao presente estudo, encontra-se sumarizada na **Tabela 5**.

Quanto ao gênero dos envolvidos, temos que 58,4% (132/226) eram do sexo masculino. A média de idade das crianças foi de 14,72 meses [desvio padrão (d.p.) = 8,99, mínimo = 0,26; máximo = 35,88; mediana = 12,45].

No geral, os dados relatados pelos responsáveis pelas crianças demonstraram que 75,3% (165/219) das crianças que necessitaram de atendimento médico por causa de diarreia viviam em famílias cujos rendimentos mensais eram inferiores a 250 dólares.

No período do estudo, a taxa média de câmbio (real por dólar americano) foi igual a R\$2,00 para cada dólar (US\$) (ASSOCIAÇÃO COMERCIAL DE SÃO PAULO, 2012).

Água encanada era presente em 93,8% (212/226) dos domicílios.

Quanto à escolaridade materna, dois responsáveis não forneceram tal informação (0,9%; 2/226). Temos que 12,8% (29/226) das mães possuíam até quatro anos de estudo formal; 43,8% (99/226) tiveram entre 5 e 9 anos de escolaridade (até o primeiro grau completo) e 42,5% (96/226) tinham mais de 9 anos de escolaridade, o que equivale ao ensino médio incompleto (n=42), completo (n=53) ou ensino superior incompleto (n=1).

**Tabela 5:** Detalhes da população estudada e informações socioeconômicas das 226 crianças atendidas com diarreia em salas de emergência hospitalar em Fortaleza, Ceará, Brasil, durante o período de Maio/2008 a Abril/2009.

<b>Característica</b>	<b>% (n)</b>	<b>Média ± d.p.</b>	<b>Variação (mín.-máx.; mediana)</b>
Gênero Masculino	58,41% (132/226)	-	-
<b>Idade</b>			
0-6 meses	18,6% (42/226)	14,7 ± 8,9	0,26-38,9; 12,45
6,1-12 meses	30,1% (68/226)		
12,1-24 meses	31,8% (72/226)		
>24 meses	19,5% (44/226)		
Total	226 (100%)		
<b>Rendimento mensal (US\$)*</b>			
0-100	7,1% (16/226)	73.1 ± 29.3	0-100; 75.5
101-200	28,3% (64/226)	175.9 ± 28.8	125-200; 200
201-250	37,6% (85/226)	226.1 ± 18.9	201-250; 230
251-350	11,1% (25/226)	310.8 ± 26.6	260-350; 300
>350	12,8% (29/226)	479.0 ± 146.0	375-1,000; 400
Informação omitida	3,1% (7/226)	-	-
Total	100% (226)	243.4 ± 121.4	0-1,000; 207.5
<b>Água encanada</b>			
Sim	93,8% (212/226)	-	-
Não	6,2% (14/226)	-	-
Total	100% (226)	-	-
<b>Escolaridade materna (anos de educação formal)</b>			
Até 4 anos	12,8% (29/226)	-	-
Entre 5-8 anos	43,8% (99/226)	-	-
Acima de 9 anos	42,5% (96/226)	-	-
Informação omitida	0,9% (2/226)	-	-
Total	100% (226)	-	-

Fonte: Própria autora.

\*No período do estudo, a taxa média de câmbio foi: 1US\$ = R\$2,00 (ASSOCIAÇÃO COMERCIAL DE SÃO PAULO, 2012). Legenda: d.p.: desvio padrão; mín.: mínimo; máx.: máximo.



## 5.2 Dados clínicos

As crianças envolvidas tiveram reportados os sinais clínicos relatados pelos guardiões em questionário. A doença diarreica apresentada por essas crianças foi considerada de moderada a grave com base nos sinais clínicos e também no fato de que os responsáveis buscaram atendimento médico por causa do evento.

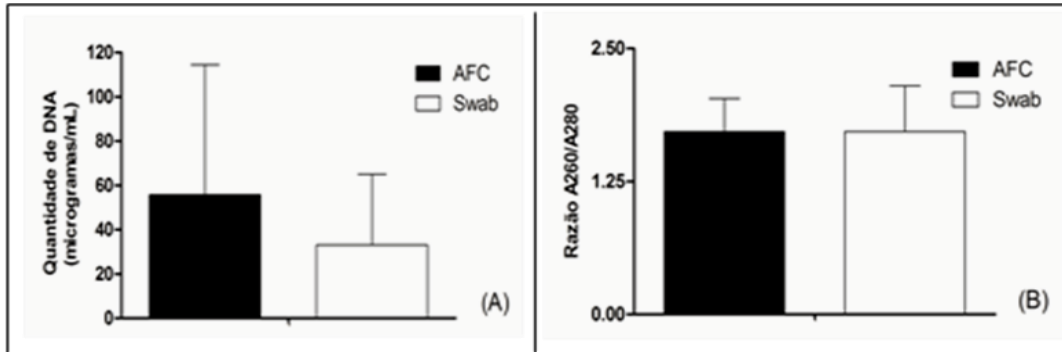
De acordo com as respostas dos pais ao questionário, temos que: 96,8% (214/221) das crianças apresentavam diarreia aguda, definida como diarreia com duração inferior a 14 dias, ao contrário de 3,2% (7/221) que apresentavam diarreia a 14 dias ou mais (média= 4,04 dias; d.p.= 3,26; mínimo= 1; mediana= 3; máximo= 28). Para cinco crianças não foi possível obter essa informação. Quanto ao número de evacuações, foi constatado que em média, as crianças apresentaram 5,51 evacuações/dia (d.p.= 2,92; mediana= 5; máximo= 20).

Na maioria dos casos, os formulários foram completamente preenchidos, revelando a seguinte distribuição dos parâmetros clínicos: 25,9% (58/224) apresentaram sangue nas fezes; em 70,8% (155/219) foi relatada ocorrência de dor abdominal (sete responsáveis não souberam responder tal questão); 76,4% (172/225) apresentaram febre e 72,4% (163/225) apresentaram vômitos.

## 5.3 Dados laboratoriais iniciais

Todas as amostras fecais (alíquotas pesadas de 200mg ou *swabs*) tiveram DNA extraído e quantificado. A extração de DNA foi bastante similar entre os tipos de amostra, ou seja, amostras fecais e amostras tipo *swab*, sendo que não houve diferença na quantidade de DNA extraído (amostras fecais vs. *swab*) [média; mediana; mínimo-máximo (55,7 µg/mL; 31,65 µg/mL; 2,00-702,9 µg/mL vs. 33,0 µg/mL; 24,1 µg/mL; 2,00-183,7 µg/mL)], ou na qualidade do DNA extraído [média da razão entre as leituras espectrofotométricas nas absorvâncias A260/A280 ± d.p. (1,72 ± 0,31 vs. 1,72 ± 0,43)], demonstrando que as amostras apresentaram um padrão satisfatório de qualidade e concentração final para uso (**Figura 8**). Sabendo-se que foram utilizados dois microlitros de DNA por reação, foram adicionados, portanto, uma média de 110 ng (amostras fecais) ou 66 ng (*swab*) de DNA por reação de amplificação, sendo a menor quantidade adicionada para ambos os tipos de amostras, 4 ng de DNA/reação.

**Figura 8:** Representação esquemática dos dados sobre quantidade e qualidade obtidas de DNA genômico extraído a partir de dois diferentes tipos de amostra fecal.

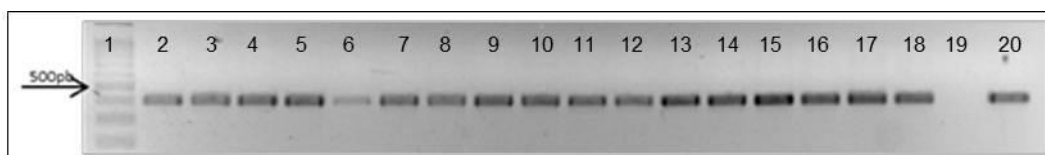


Fonte: Própria autora.

**8.A)** Representação da quantidade de DNA extraída ( $\mu\text{g/mL}$ ) a partir de dois diferentes tipos de amostra ( $p > 0,05$ ), dada pela leitura espectrofotométrica em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), nos comprimentos de onda 230, 260, 280 e 320 nm. **8.B)** Qualidade do DNA extraído a partir de dois diferentes tipos de amostra ( $p > 0,05$ ), dada pela razão entre as leituras das absorvâncias 260 e 280. Legenda: DNA extraído de: AFC = Amostras fecais congeladas; Swab = amostras de swab anal. Dados apresentados no 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza, CE.

Além da averiguação de quantidade e qualidade do DNA extraído de cada amostra, todas as amostras de DNA apresentaram amplificação do gene *rrs*, utilizado como controle positivo da extração de DNA genômico de coliformes fecais (**Figura 9**).

**Figura 9:** Foto da amplificação do gene *rrs*.



Fonte: Própria autora.

Coluna 1: Marcador molecular (100 pb); Colunas 2-18: Produtos amplificados (amplicons, *rrs*) de um grupo de amostras, demonstrando a amplificação de produtos de tamanho esperado (401 pb); Coluna 19: Controle negativo (água MilliQ autoclavada usada como molde); Coluna 20: Controle positivo (DNA de *E. coli* comensal, cepa HS, utilizado como molde). pb = pares de bases.

A análise de especificidade dos iniciadores utilizados para detecção tanto do gene *rrs*, como dos demais genes pesquisados no presente estudo, foi sumarizada anteriormente, no **Quadro 3**.

#### 5.4 Diagnóstico microbiológico

Pela análise microbiológica clássica, realizada em 225 amostras, foi diagnosticado pelo menos um enteropatógeno em 23,5% (53/225) das amostras, conforme demonstrado na **Tabela 6**. O diagnóstico sugestivo de *Campylobacter* sp., conforme exemplificado na **Figura 10**, ocorreu em 8,9% (20/225) dos casos.

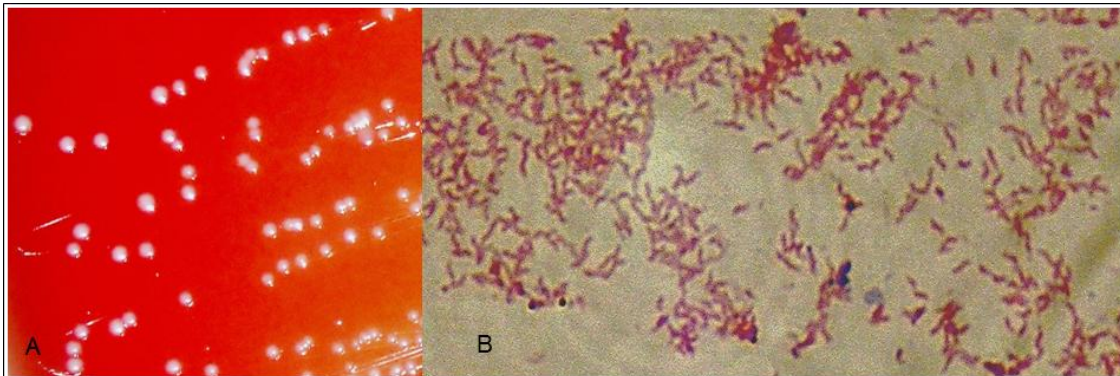
**Tabela 6:** Patógenos bacterianos identificados pela microbiologia convencional em 225 amostras de fezes diarreicas de crianças atendidas em salas de emergência hospitalar em Fortaleza, Ceará, Brasil, durante o período de Maio/2008 a Abril/2009.

Micro-organismo	Amostras positivas / Amostras testadas (%)
<i>Campylobacter</i> spp.	20/225 (8,9%)
<i>E. coli</i> (não-O157:H7)	12/225 (5,3%)
<i>Salmonella</i>	1/225 (0,5%)
<i>Shigella</i>	20/225 (8,9%)
Nenhum patógeno identificado	172/225 (76,4%)

Fonte: Própria autora.

A média de idade das crianças com o diagnóstico microbiológico sugestivo de *Campylobacter* sp. foi de 11 meses (d.p.= 6,7; mediana: 9,1; mínimo: 1,3 meses; máximo: 24,1 meses), sendo que dentre essas crianças haviam 13 meninos e 7 meninas (razão entre os gêneros = 0,65).

**Figura 10:** Diagnóstico microbiológico sugestivo de *Campylobacter* sp.



Fonte: Própria autora.

Fotos gentilmente cedidas por Dra. Ila Lima. **10.A)** Aspecto do crescimento de *Campylobacter* sp. em meio ágar CVA *Campylobacter*, ambiente micro-aerofílico,  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ : colônias pequenas brancas, não-hemolíticas. **10.B)** Coloração Gram de *Campylobacter* sp., à microscopia ótica (100X, óleo de imersão): bacilos Gram-negativos, presença de formações características em “asa de gaivota”.

A frequência, por patógeno diagnosticado, dos parâmetros clínicos e os dados sobre duração da diarreia e número de evacuações encontra-se na **Tabela 7**. Os dados da única criança com diagnóstico de *Salmonella* sp. foram omitidos da tabela, a saber: tal criança apresentou febre e sangue nas fezes, deu entrada no HIAS após dois dias com diarreia e o responsável relatou um número de oito evacuações no dia que precedeu o atendimento.

Febre e vômito foram os parâmetros clínicos mais relatados pelos pais das crianças, sendo sangue nas fezes mais reportado nas crianças com diagnóstico de *Shigella* sp. e dor abdominal frequente em crianças com diagnóstico de bactérias dos gêneros *Shigella* ou *Campylobacter*. Em geral, a partir dos dados disponíveis (220 formulários completos quanto à data da procura por atendimento) as crianças apresentaram quadro de diarreia por cerca de três dias antes do atendimento e aproximadamente cinco evacuações no dia anterior ao atendimento. Vinte e duas mães (10%, 22/220) buscaram atendimento já no segundo dia da doença diarreica, sendo que o número de evacuações no primeiro dia da doença dessas crianças variou entre três e 20 evacuações. A maioria dos responsáveis buscou atendimento com três dias a uma semana do início da doença diarreica (75,4%; 166/220); e uma proporção menor levou mais de sete dias a partir do início da doença (8-28 dias) para buscar atendimento ambulatorial para sua criança (14,5%; 32/220).

**Tabela 7:** Frequência dos parâmetros clínicos relatados e dados sobre a doença diarreica das crianças do estudo que tiveram amostras testadas pela análise microbiológica convencional.

Micro-organismo	Parâmetros clínicos relatados Número (%) de casos				Dados da doença Média ± s.d.; mediana (mín. – máx.)	
	Vômito	Sangue nas fezes	Dor abdominal	Febre	Dias com diarreia	Evacuações <sup>①</sup>
<i>Campylobacter</i> sp.	12/20 (60%)	6/20 (30%)	14/20 (70%)	14/20 (70%)	3,5 ± 1,8; 3,0 (1-8)	5,7 ± 2,5; 5,0 (2-10)
<i>E. coli</i>	10/12 (83%)	2/12 (17%)	4/12 (33%)	8/12 (67%)	4,1 ± 3,6; 3,5 (1-15)	5,0 ± 2,5; 5,0 (1-10)
<i>Shigella</i>	16/20 (80%)	13/20 (65%)	17/20 (85%)	20/20 (100%)	4,4 ± 2,9; 4,5 (1-12)	6,0 ± 3,1; 6,5 (1-10)
NPI <sup>②</sup>	124/172 (72%)	36/172 (21%)	119/172 (69%)	127/172 (74%)	4,1 ± 3,4; 3,0 (1-28)	5,4 ± 2,9; 5,0 (1-20)
<b>Total</b>	162/225 (72%)	58*/225 (26%)	154/225 (68%)	170*/225 (75%)	3,0 ± 3,2; 3,0 (1-28)	5,0 ± 2,9; 5,0 (1-20)

Fonte: Própria autora.

\*Foram omitidos da tabela os dados da única criança com diagnóstico de *Salmonella*. A mesma apresentou sangue nas fezes e febre. Legenda: ① Evacuações = Número de evacuações no dia anterior ao atendimento.

② NPI = Nenhum patógeno identificado.

### 5.5 Detecção molecular (PCR) de *C. jejuni/coli*

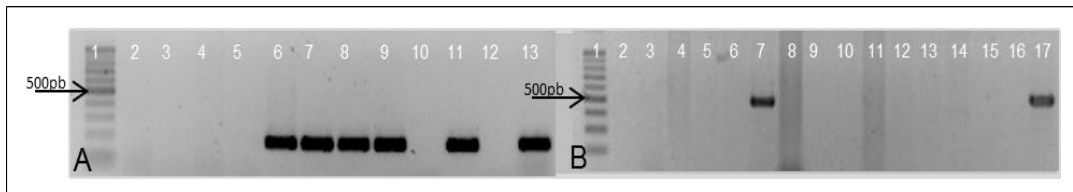
Após a quantificação do DNA extraído das amostras e da amplificação do controle interno *rrs*, todas as amostras de DNA fecal (n=226) foram levadas à amplificação dos genes propostos como genes-diagnóstico: *hipO* (para *C. jejuni*) e *ask* (para *C. coli*) (**Figura 11**).

A detecção de *C. jejuni* ocorreu em 19,5% das crianças (44/226) e a detecção de *C. coli* ocorreu em 1,3% das crianças (3/226).

Dentre as amostras hospitalares com diagnóstico da microbiologia clássica sugestivo de *Campylobacter* sp. (20 amostras), 17 obtiveram detecção de *C. jejuni* (*hipO*<sup>+</sup>) e, em três

delas não ocorreu amplificação de nenhum dos genes diagnóstico pesquisados (*hipO* ou *ask*). O diagnóstico molecular por PCR convencional ocorreu em maior proporção nas crianças do sexo masculino (0,57), porém sem significado estatístico.

**Figura 11:** Foto da amplificação dos genes *hipO* e *ask*.



Fonte: Própria autora.

**11.A)** Coluna 1: Marcador molecular (100bp); Colunas 2-11: Amplicons (gene *hipO*) de um grupo de amostras, demonstrando a amplificação de produtos de tamanho esperado (176 pb); Coluna 12: Controle negativo (água MilliQ autoclavada usada como molde); Coluna 13: Controle positivo (DNA de *C. jejuni*, ATCC 33291, utilizado como molde).

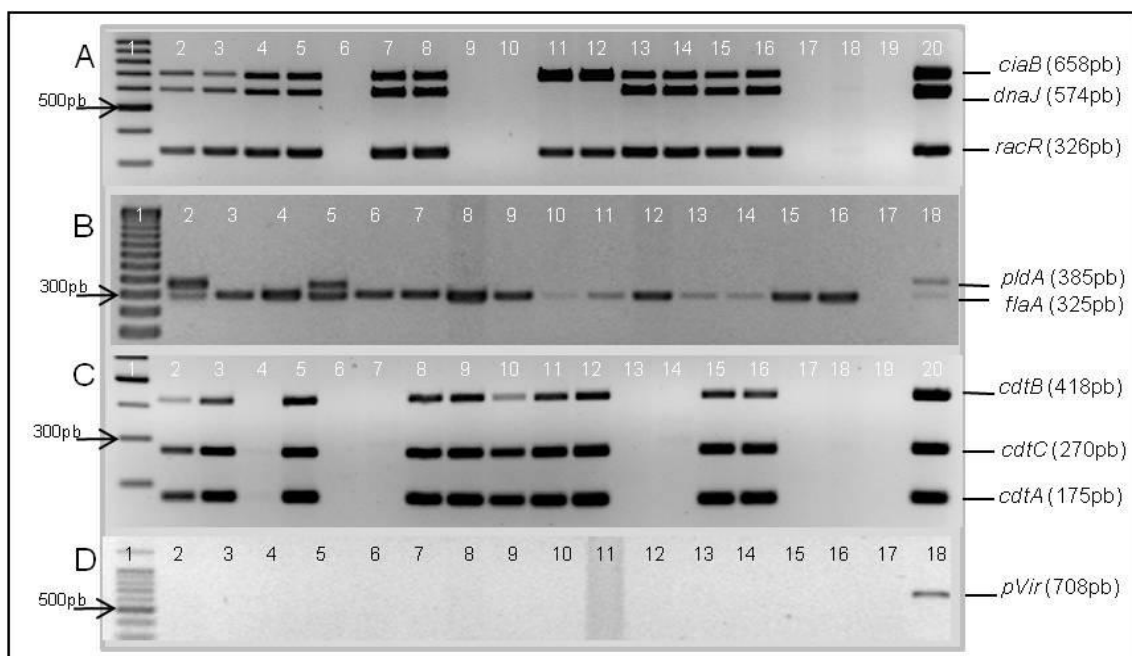
**11.B)** Coluna 1: Marcador molecular (100bp); Colunas 2-18: Amplicons (gene *ask*) de um grupo de amostras, demonstrando a amplificação de produto de tamanho esperado (502 pb); Coluna 16: Controle negativo (água MilliQ autoclavada usada como molde); Coluna 17: Controle positivo (DNA de *C. coli*, INCQS 00263, utilizado como molde). pb = pares de bases.

A detecção molecular foi utilizada como parâmetro para todas as análises estatísticas subsequentes, sendo que não houve diferença entre as crianças com e sem detecção de *C. jejuni* (*hipO*<sup>+</sup> vs. *hipO*<sup>-</sup>) quanto à idade, quanto aos dias de duração de diarreia [média±d.p.; mediana (3,7 ± 2,8; 3,0 vs. 3,7 ± 2,8; 3,0)], ou quanto ao número de evacuações/dia (5,6 ± 2,5; 5,5 vs. 5,5 ± 3,0; 5,0), nem quanto aos parâmetros clínicos avaliados, ou seja, presença de sangue nas fezes (29,5% vs. 25%, p=0,567), febre (77,3% vs. 76,2%, p=1,00), dor abdominal (70,5% vs. 70,9%, p=1,00) ou ocorrência de vômito (61,4% vs. 75,1%, p=0,089) (p> 0,05; teste exato de Fisher).

## 5.6 Detecção molecular de genes de virulência de *C. jejuni*

Os genes de virulência de *C. jejuni* (*flaA*, *pldA*, *ciaB*, *racR*, *dnaJ*, *cdtABC* e *pVir*) foram pesquisados (**Figura 12**) no DNA genômico das amostras fecais cuja detecção do gene *hipO* ocorreu, ou seja, nas amostras diagnosticadas como *C. jejuni*-positivas (*hipO*<sup>+</sup>), perfazendo um total de 44 amostras pesquisadas.

**Figura 12:** Foto da amplificação dos genes de virulência de *C. jejuni*.



Fonte: Própria autora.

**12.A)** Coluna 1: Marcador molecular (100pb); Colunas 2-18: Amplicons de um grupo de amostras, mostrando amplificação de produtos de tamanho esperado (*ciaB* – 658pb, *dnaJ* – 574pb, *racR* – 326pb) em uma bateria de amostras; Coluna 19: Controle negativo (água MilliQ autoclavada usada como molde); Coluna 20: Controle positivo (DNA de *C. jejuni*, ATCC 33291, utilizado como molde). **12.B)** Coluna 1: Marcador molecular (100pb); Colunas 2-16: Amplicons de um grupo de amostras, mostrando amplificação de produtos de tamanho esperado (*pldA* – 385pb, *flaA* – 325pb) em uma bateria de amostras; Coluna 17: Controle negativo (água MilliQ autoclavada usada como molde); Coluna 18: Controle positivo (DNA de *C. jejuni*, ATCC 33291, utilizado como molde). **12.C)** Coluna 1: Marcador molecular (100pb); Colunas 2-18: Amplicons de um grupo de amostras, mostrando amplificação de produtos de tamanho esperado (*cdtA* – 175pb, *cdtB* – 418pb, *cdtC* – 270pb) em uma bateria de amostras; Coluna 19: Controle negativo (água MilliQ autoclavada usada como molde); Coluna 20: Controle positivo (DNA de *C. jejuni*, ATCC 33291, utilizado como molde). **12.D)** Coluna 1: Marcador molecular (100pb); Colunas 2-16: Amostras; Coluna 17: Controle negativo (água MilliQ autoclavada usada como molde); Coluna 18: Controle positivo (DNA de *C. jejuni*, ATCC 33291, utilizado como molde). pb= pares de bases.

Com exceção do gene *pVir*, que não foi identificado em nenhuma das amostras (exceto controle positivo), todas as amostras *hipO*<sup>+</sup> apresentaram detecção dos genes de virulência. Dentre as amostras testadas, ao menos um gene relacionado à colonização (*flaA*, *racR* ou *dnaJ*) e, adicionalmente, um gene relacionado à invasão (*ciaB* ou *pldA*) foram detectados em todas as amostras. Além disso, o gene para a toxina citoletal distensora foi detectado em 95,4% (42/44) das amostras.

Com relação a um perfil geral sobre a detecção dos genes de virulência de *C. jejuni*, destacada no **Quadro 4**, é possível inferir que, a distribuição encontrada é bastante heterogênea dentre as amostras positivas para *C. jejuni* (*hipO*<sup>+</sup>), não sendo possível, à primeira vista, a determinação de grupos bem definidos dentre os genes identificados. Dentre as amostras *hipO*<sup>+</sup> pesquisadas, 84,1% (37/44) foram positivas para cinco ou seis genes de virulência, e em 15,9% (7/44) das amostras houve detecção de 2-4 genes de virulência.

**Quadro 4:** Distribuição dos genes de virulência entre as amostras de DNA fecal com detecção de *C. jejuni* (*hipO*<sup>+</sup>).

Grupo	Genes						n (%)
	Colonização			Invasão		Toxina	
	<i>dnaJ</i>	<i>flaA</i>	<i>racR</i>	<i>ciaB</i>	<i>pldA</i>	<i>cdtABC</i>	
<i>hipO</i> <sup>+</sup>	+	+	+	+	+	+	14 (31,8%)
	+	+	+	+	Negativo	+	19 (43,2%)
	+	Negativo	+	+	Negativo	+	3 (6,8%)
	+	Negativo	+	+	+	+	3 (6,8%)
	Negativo	Negativo	+	+	+	+	1 (2,3%)
	Negativo	+	+	+	+	+	1 (2,3%)
	Negativo	+	Negativo	Negativo	+	+	1 (2,3%)
	Negativo	Negativo	+	+	Negativo	Negativo	2 (4,5%)
					<b>Total</b>		44 (100%)

Fonte: Própria autora.

Ao analisar combinações de genes relacionados à colonização, temos que 9,1% (4/44) das amostras apresentaram somente um dos genes (*flaA*, *racR* ou *dnaJ*); 15,9% (7/44) apresentaram dois dos genes relacionados à colonização e, a grande maioria, ou seja, 75% (33/44) apresentou os três genes pesquisados relacionados ao processo de colonização bacteriana. Com relação às combinações de genes relacionados à invasão bacteriana (*ciaB* e



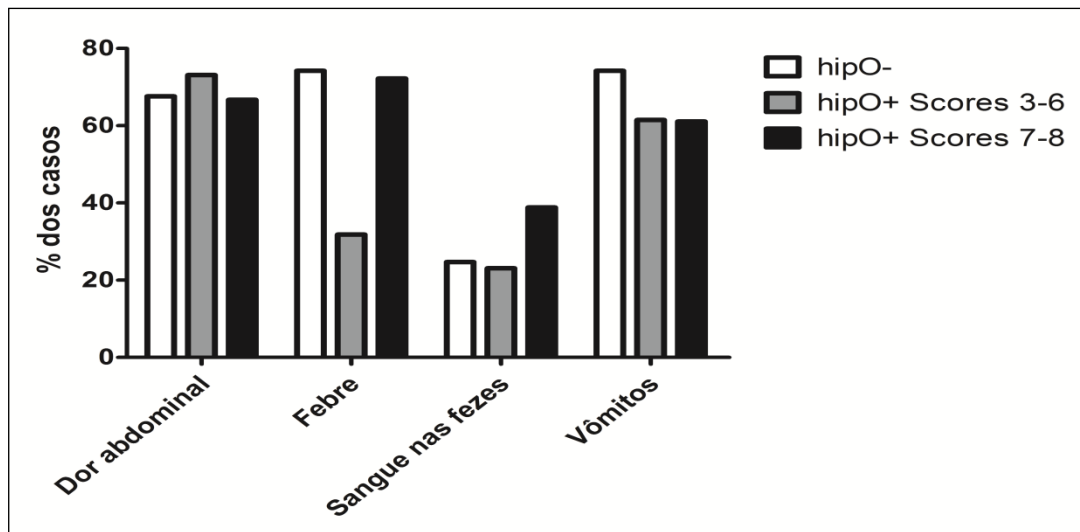
*pldA*), temos um perfil supostamente heterogêneo, sendo que 56,8% (25/44) das amostras apresentava somente um dos genes (*ciaB* ou *pldA*) e 43,2% (19/44) apresentam os dois genes pesquisados relacionados à invasão bacteriana.

As prevalências individuais de cada gene estudado, sem levar em conta as combinações, foram em ordem decrescente: 97,7% (43/44) para *racR* e *ciaB*; 95,4% (42/44) para *cdtABC*; 88,6% (39/44) para *dnaJ*; 79,5% para *flaA* (35/44) e 45,4% para *pldA*.

Devido à grande diversidade do grupo, buscamos uma classificação do mesmo em escores a depender do número e da finalidade dos genes de virulência de *C. jejuni* detectados. Tal classificação se deu da seguinte forma: genes relacionados à colonização (*flaA*, *racR* ou *dnaJ*) ou produção de toxinas (*cdtABC*) foram pontuados como 01 ponto por cada detecção e os genes relacionados à invasão bacteriana valeram 02 pontos cada. Tal pontuação dividiu a população *hipO*<sup>+</sup> em escores alto (pontuação igual a 7 ou 8, n=18) ou baixo (pontuação entre 3 e 6, n=26).

De acordo com a reorganização descrita, temos um perfil que relaciona as crianças que tiveram diagnóstico molecular de *C. jejuni* e os parâmetros clínicos apresentados pelas mesmas no **Figura 13**. Não houve diferença estatística entre os grupos, embora as crianças com detecção de *C. jejuni* e escores 7 ou 8 para os genes de virulência tenham mostrado uma tendência em apresentar o parâmetro clínico “sangue nas fezes” (38,8%; 7/18) do que as crianças com detecção de *hipO* e escores 3-6 para os genes de virulência (23,1%; 6/26) ou ainda, do que as crianças sem detecção de *C. jejuni* (24,7%; 45/182).

**Figura 13:** Frequência dos parâmetros clínicos relatados nas crianças do estudo que tiveram amostras testadas para a detecção de genes de virulência de *C. jejuni*.



Fonte: Própria autora.

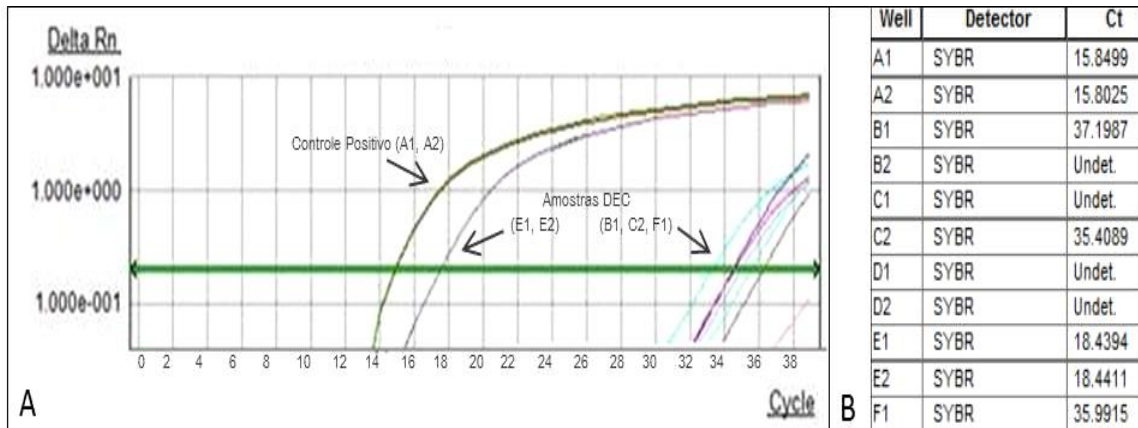
*hipO*<sup>-</sup>: Amostras testadas por PCR comum sem detecção de *hipO* (*C. jejuni*, n=182), *hipO*<sup>+</sup>: Amostras testadas por PCR comum com detecção de *hipO* (*C. jejuni*, n=44). Escores para a detecção dos genes de virulência de *C. jejuni* foram calculados para as amostras *hipO*<sup>+</sup>, de acordo com a atribuição de 01 ponto para a detecção de cada gene relacionado à colonização bacteriana (*flaA*, *racR* ou *dnaJ*) ou à produção de toxinas (*cdtABC*) e atribuição de 02 pontos para cada gene relacionado à invasão celular (*ciaB*, *pldA*). Aproximadamente 59% (26/44) das amostras *hipO*<sup>+</sup> tiveram escores de detecção dos genes de virulência considerados como baixo score (3 a 6 pontos) e 41% (18/44) das amostras *hipO*<sup>+</sup> tiveram scores de detecção dos genes de virulência considerados como alto score (entre 7 e 8 pontos). Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

### 5.7 Detecção de *Campylobacter* sp. por RT-PCR

A detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp. por RT-PCR, exemplificada na **Figura 14**, foi realizada em 225 amostras, tendo ocorrido tal detecção (*gyrA*<sup>+</sup>) em 26,7% (60/225) das amostras, ocorrendo um leve predomínio de crianças do sexo masculino nesse grupo (0,57), sem significado estatístico.

Dentre as amostras com diagnóstico da microbiologia clássica sugestivo de *Campylobacter* sp. (20 amostras), 18 obtiveram detecção de *Campylobacter* sp. por RT-PCR (*gyrA*<sup>+</sup>) e, em duas delas não ocorreu amplificação pelo RT-PCR (*gyrA*<sup>-</sup>).

**Figura 14:** Reação de RT-PCR para detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp.



Fonte: Própria autora.

Figuras gentilmente cedidas por Dr. Bernhard Weigl. **14.A)** Aspecto da curva gerada na detecção de incorporação de *SYBR Green*. A amplificação dos poços do controle positivo (poços A1 e A2) ocorreu no ciclo limiar 15,8 e a amplificação de amostras DEC (poços B1, C2, E1, E2 e F1) ocorreu entre os ciclos 18,4 e 37,2. **14.B)** Quadro contendo os resultados dos poços testados em valor do ciclo limiar (Ct). *Cycle*: ciclo, *Delta Rn*: Quantidade aproximada de cópias do gene *gyrA*; o limiar de positividade (*threshold*) foi estipulado em 0,2. *Detector*: sistema de detecção utilizado, no caso, detecção da incorporação de *SYBR Green*. *Ct*: ciclo limiar, ou seja, ciclo no qual a amostra em questão apresentou amplificação acima do limiar basal de fluorescência, do inglês, *cycle threshold*.

A detecção molecular de *gyrA* por RT-PCR também foi utilizada como parâmetro para algumas análises estatísticas subsequentes, sendo que não houve diferença entre as crianças com e sem detecção de *gyrA* ( $gyrA^+$  vs.  $gyrA^-$ ) quanto à idade, quanto aos dias de duração de diarreia [média±d.p.; mediana (3,8±2,9; 3,0 vs. 4,1±3,4; 3,0)], ou quanto ao número de evacuações/dia (5,3±2,3; 5,0 vs. 5,5±3,1; 5,0), nem quanto aos parâmetros clínicos avaliados, ou seja, presença de sangue nas fezes (30,0% vs. 24,5%,  $p=0,49$ ), febre (75,0 % vs. 75,6%,  $p=1,00$ ), dor abdominal (66,7% vs. 72,3%,  $p=0,41$ ) ou ocorrência de vômito (65,0% vs. 75,0%,  $p=0,177$ ) ( $p > 0,05$ ; teste exato de Fisher).

## 5.8 Detecção de *Campylobacter* sp. por ELISA

A ELISA para detecção de *Campylobacter* sp. foi realizada em apenas 153 amostras, devido à falta de espécime clínico para a realização de todos os testes. A detecção de *Campylobacter* sp. por ELISA ocorreu em 37,9% (58/153) dos sujeitos pesquisados.

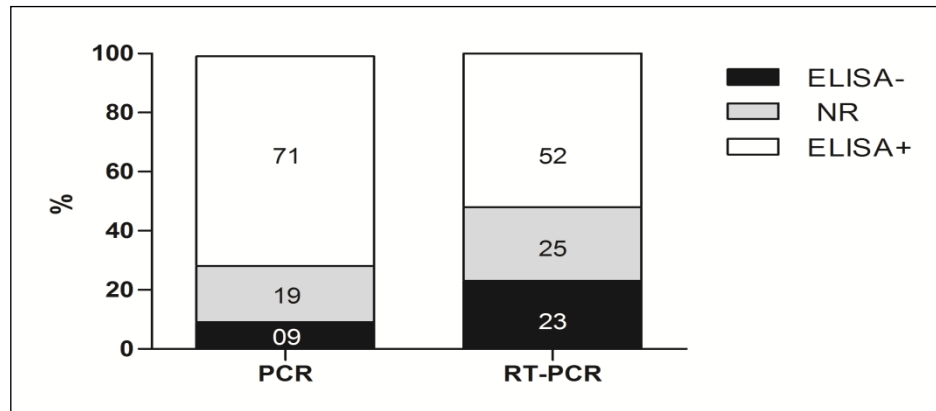
Considerando-se esse diagnóstico imunoenzimático, houve novamente um leve predomínio do gênero masculino (0,62), mais uma vez, sem significado estatístico ( $p > 0,05$ ).

Dentre as amostras com diagnóstico da microbiologia clássica sugestivo de *Campylobacter* sp. (20 amostras), todas tiveram resultado positivo pelo ensaio comercial *Campylobacter ProSpect Microplate Assay* (Remel, EUA).

Com relação às amostras com diagnóstico positivo por PCR comum (detecção dos genes *hipO* ou *ask*, para *C. jejuni* ou *C. coli*, respectivamente), ou seja, 20,3% das amostras (46/226), o resultado da ELISA foi o seguinte: em 71,7% (33/46) das amostras *hipO*<sup>+</sup>, o diagnóstico por ELISA foi confirmado; para 19,6% (9/46) dessas amostras, não havia quantidade suficiente de material para a realização da ELISA e; em 8,7% (4/46) desses casos ocorreu um resultado negativo pela ELISA (**Figura 15**).

Com relação às amostras com diagnóstico positivo pela PCR em tempo real (RT-PCR) (detecção do gene *gyrA*, de *Campylobacter* sp.), ou seja, 26,7% das amostras (60/225), o resultado da ELISA foi: 51,7% (31/60) das amostras *gyrA*<sup>+</sup> tiveram também o diagnóstico por ELISA confirmado, 25% (15/60) não apresentaram quantidade de amostra suficiente para a realização da ELISA e 23,3% (14/60) apresentaram resultados negativos pela ELISA (**Figura 15**).

**Figura 15:** Perfil da porcentagem dos resultados de ELISA obtidos nas amostras com detecção molecular de *C. jejuni/C. coli* (por PCR) ou *Campylobacter* sp. (por RT-PCR).



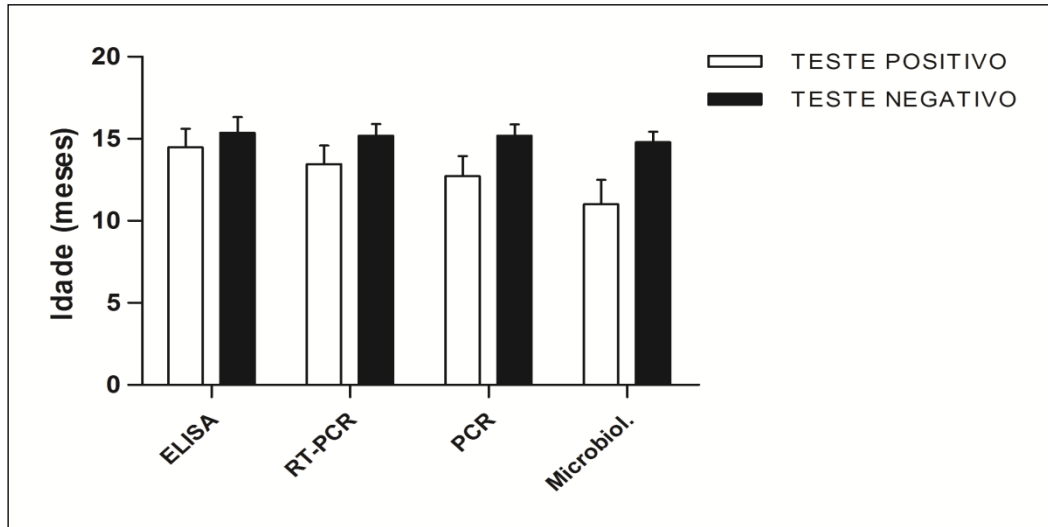
Fonte: Própria autora.

ELISA: Ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de superfície de *C. jejuni/C.coli*, *Campylobacter ProSpect*, Remel (USA); RT-PCR: PCR em tempo real para detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp. ; PCR: PCR comum para detecção de *C. jejuni* (gene *hipO*) ou *C. coli* (gene *ask*).  
 Legenda: ELISA-: Resultados de ELISA negativos. NR: Teste ELISA não realizado. ELISA+: Resultados de ELISA positivos. Tal percentual dos diagnósticos imunoenzimáticos demonstrados se referem aos encontrados para as amostras positivas para as detecções moleculares, a saber: 46 amostras positivas na PCR e 60 amostras positivas na RT-PCR.

## 5.9 Inferências sobre os testes utilizados para diagnóstico

Nos quatro testes utilizados, houve uma tendência de diagnósticos positivos entre as crianças mais jovens, com discreta discrepância no diagnóstico microbiológico, como demonstrado na **Figura 16**. Porém, não houve diferença estatística entre os grupos.

**Figura 16:** Média das idades das crianças cujas amostras foram testadas quanto à detecção de *Campylobacter* sp.



Fonte: Própria autora.

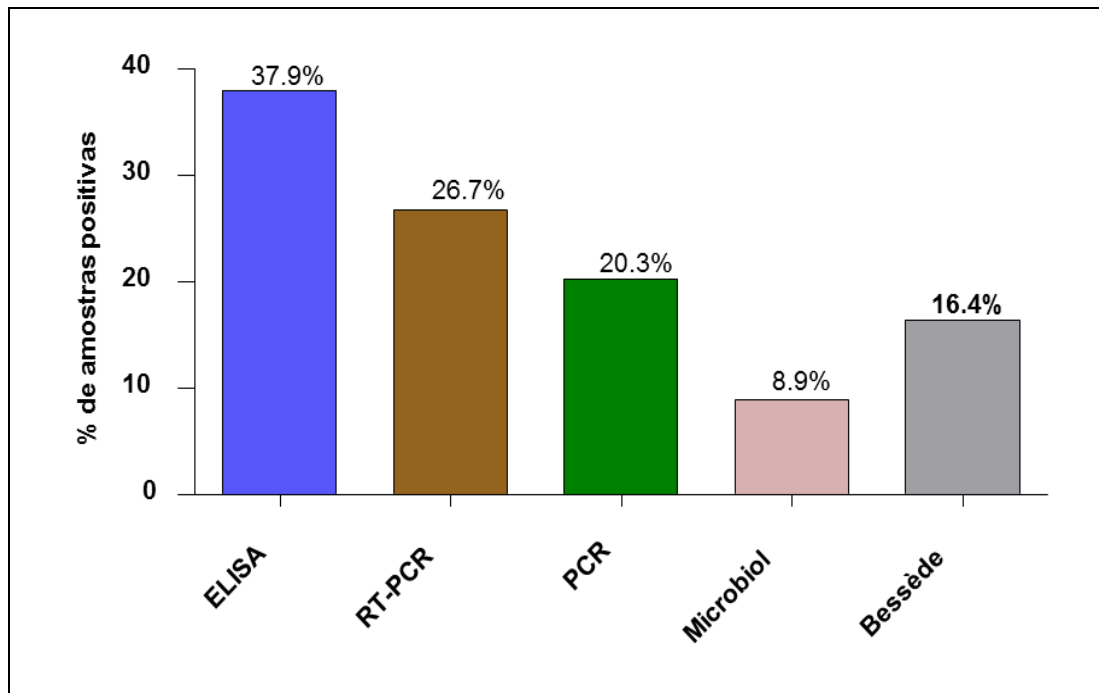
ELISA: Ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de superfície de *C. jejuni/C.coli*, *Campylobacter ProSpect*, Remel (EUA) ; RT-PCR: PCR em tempo real para detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp. ; PCR: PCR comum para detecção de *C. jejuni* (gene *hipO*) ou *C. coli* (gene *ask*); Microbiol.: Diagnóstico microbiológico de *Campylobacter* sp.

Houve variações entre o percentual de positividade encontrado para cada teste diagnóstico, sendo que as diferenças de detecção podem ser visualizadas na **Figura 17**.

Um trabalho recente, que será debatido adiante (**Item 6**), sugere que, na falta de diagnóstico microbiológico positivo, sejam consideradas positivas as amostras com detecção em testes moleculares e, adicionalmente, resultado positivo em algum ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de *Campylobacter* sp. (BESSÈDE *et al*, 2011).

Segundo essa definição de Bessède *et al.*, teríamos o valor de 16,4% (37/226) como a prevalência final estimada de *Campylobacter* sp. entre as crianças de 0-36 meses de idade com doença diarreica sintomática na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil.

**Figura 17:** Percentual de positividade encontrado com diferentes métodos de detecção de *Campylobacter* sp.



Fonte: Própria autora.

ELISA: Ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de superfície de *C. jejuni/C.coli*, *Campylobacter ProSpect*, Remel (EUA) ; RT-PCR: PCR em tempo real para detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp. ; PCR: PCR comum para detecção de *C. jejuni* (gene *hipO*) ou *C. coli* (gene *ask*); Microbiol.: Diagnóstico microbiológico de *Campylobacter* sp.; Bessède: Percentual de amostras positivas conforme critério sugerido por Bessède *et al.* (2011), ou seja, amostras são consideradas positivas para *Campylobacter* sp. quando ocorre diagnóstico microbiológico ou detecção positiva em um dos testes moleculares (PCR ou RT-PCR) e na ELISA.

Notamos, pela análise das curvas de positividade, que o teste mais sensível foi ELISA (37,9%;58/153), seguido de RT-PCR (26,7%; 60/225), PCR (20,3%; 46/226) e o, que apresentou menor percentual de diagnósticos foi a cultura microbiológica seletiva (8,9%; 20/225).

A distribuição do perfil de positividade para os casos estudados pela utilização das diferentes técnicas para detecção de *Campylobacter* sp. aqui utilizadas encontra-se na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Distribuição do perfil de positividade para os casos estudados pela utilização de diferentes técnicas para detecção de *Campylobacter* sp.

Número de casos	Resultado			
	Cultura	ELISA	RT-PCR	PCR
Diagnóstico microbiológico positivo (n=20)				
16	+	+	+	+
2	+	+	+	-
1	+	+	-	+
1	+	+	-	-
Outros diagnósticos positivos (n=47)				
12	-	+	+	+
4	-	+	-	+
1	-	+	+	-
3	-	-	-	+
2	-	-	+	+
6	-	NR	+	+
1	-	NR	-	+
8	-	NR	+	-
22	-	+	-	-

Fonte: Própria autora.

Legenda: Cultura: Diagnóstico microbiológico de *Campylobacter* sp.; ELISA: Ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de superfície de *C. jejuni/C.coli*, *Campylobacter ProSpect*, Remel (EUA) ; RT-PCR: PCR em tempo real para detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp. ; PCR: PCR comum para detecção de *C. jejuni* (gene *hipO*) ou *C. coli* (gene *ask*); +: Resultado positivo; -: Resultado negativo; NR: Teste não realizado. Amostras em cinza: Além das amostras com cultura positiva, na falta desse diagnóstico, serão consideradas também positivas para *Campylobacter* sp. as amostras com diagnóstico positivo em um dos testes moleculares (PCR ou RT-PCR) e, adicionalmente, resultado positivo na ELISA (conforme Bessède *et al*, 2011).



As análises de concordância foram realizadas, com relação ao padrão-ouro, ou seja, a microbiologia convencional, para os diagnósticos moleculares (PCR e RT-PCR), e o ensaio imunoenzimático, como demonstrado na **Tabela 9**.

**Tabela 9:** Graus de concordância (índice de Kappa) e percental de discordância encontrados entre os resultados dos testes Microbiologia convencional e ELISA, PCR e RT-PCR.

<u>Testes</u>	<u>Microbiologia (<i>Campylobacter</i> sp.)</u>		<u>Índice de Kappa</u> (% Discordância)
	<u>Negativo</u> % (n)	<u>Positivo</u> % (n)	
<u>vs. ELISA</u>			
Negativo % (n)	71,2% (94/132)	0% (0/20)	0,394± 0,068 (25%)
Positivo % (n)	28,8% (38/132)	100% (20/20)	
<u>vs. PCR</u>			
Negativo % (n)	86,9% (179/206)	15% (3/20)	0,466± 0,079 (13,3%)
Positivo % (n)	13,1% (27/206)	85% (17/20)	
<u>vs. RT-PCR</u>			
Negativo % (n)	79,5% (163/205)	10% (2/20)	0,372 ± 0,069 (19,5%)
Positivo % (n)	20,5% (42/205)	90% (18/20)	

Fonte: Própria autora.

PCR: PCR comum para detecção de *C. jejuni* (gene *hipO*) ou *C. coli* (gene *ask*); ELISA: Ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de superfície de *C. jejuni/C.coli*, *Campylobacter ProSpect*, Remel (EUA) ; RT-PCR: PCR em tempo real para detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp.

As análises de concordância também foram realizadas entre os diagnósticos moleculares entre si (PCR e RT-PCR), e destes, individualmente, com relação ao ensaio imunoenzimático, como demonstrado na **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Graus de concordância (índice de Kappa) e percental de discordância encontrados entre os resultados dos testes PCR, ELISA e RT-PCR.

<u>Testes</u>	<u>PCR</u>		<u>Índice de Kappa</u> (% Discordância)
	<u>Negativo</u> % (n)	<u>Positivo</u> % (n)	
<u>vs. ELISA</u>			
Negativo % (n)	58,8% (90/153)	2,61% (4/153)	0,552± 0,069 (19,6%)
Positivo % (n)	17,0% (26/153)	21,6% (33/153)	
<u>vs. RT-PCR</u>			
Negativo % (n)	69,8% (157/225)	3,5% (8/225)	0,603± 0,062 (14,2%)
Positivo % (n)	10,7% (24/225)	16,0% (36/225)	
<u>vs. ELISA</u>			
<u>RT-PCR</u>			
Negativo % (n)	53,0% (81/153)	9,1% (14/153)	0,403 ± 0,076 (26,7%)
Positivo % (n)	17,6% (27/153)	20,3% (31/153)	

Fonte: Própria autora.

PCR: PCR comum para detecção de *C. jejuni* (gene *hipO*) ou *C. coli* (gene *ask*); ELISA: Ensaio imunoenzimático para detecção de antígenos de superfície de *C. jejuni/C.coli*, *Campylobacter ProSpect*, Remel (EUA) ; RT-PCR: PCR em tempo real para detecção do gene *gyrA* de *Campylobacter* sp.

Entre os testes moleculares, o coeficiente de Kappa foi igual a 0,603, tendo os dois testes moleculares, portanto, alcançado um grau de concordância moderada entre si. Já as análises de concordância entre os testes moleculares e a ELISA *ProSpect® Campylobacter* alcançou o coeficiente de Kappa de 0,402 (com relação ao RT-PCR) e 0,552 (com relação ao PCR comum), tendo o teste ELISA, portanto, alcançado um grau de concordância considerável a moderada com tais testes moleculares, respectivamente. A concordância entre tais testes deve ainda ser avaliada à luz das especificidades dos iniciadores utilizados, demonstradas no **Quadro 3** e discutidas adiante.

Considerando uma prevalência de 6,0% para a detecção de *Campylobacter* sp.; conforme sugerido anteriormente (QUETZ *et al.*, 2012), de acordo com estudos nacionais de prevalência, foram determinados os valores de sensibilidade, de especificidade, acurácia, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e razões de verossimilhança positiva

(RVP) e negativa (RVN) dos testes ELISA, PCR e RT-PCR em relação ao diagnóstico microbiológico, conforme demonstrado na **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Medidas simples de acurácia dos testes ELISA, RT-PCR e PCR em comparação com a cultura microbiológica.

Testes	S (%)	E (%)	VPP	VPN	RVP	RVN	Acurácia (%)
ELISA	100,0	71,2	18,1	100,0	3,5	0,00	75,0
RT-PCR	90,0	79,9	22,2	99,2	4,5	0,12	80,8
PCR	85,0	86,8	29,2	98,9	6,4	0,17	86,7

Fonte: Própria autora.

Foi assumida uma prevalência de 6,0% para as infecções entéricas por *Campylobacter* sp., conforme trabalho anterior (QUETZ *et al.*, 2012). Legenda: S = Sensibilidade; E = Especificidade; VPP = Valor preditivo positivo; VPN = Valor preditivo negativo; RVP = Razão de verossimilhança positiva; RVN = Razão de verossimilhança negativa.

## 6 DISCUSSÃO

As doenças diarreicas constituem uma das causas principais de morbidade no mundo, principalmente em países em desenvolvimento. Mesmo com as melhorias no manejo clínico da doença, principalmente com a terapia de reidratação oral que conduziu a uma diminuição importante da mortalidade (VICTORA *et al.*, 2000), se faz necessário avaliar o impacto da morbidade das doenças diarreicas sobre a população infantil, assim como o papel de micro-organismos específicos (DUPONT, 2005).

Durante um episódio de diarreia, a recomendação de internação se restringe aos casos complicados com desidratação grave, risco de choque hipovolêmico e risco de óbito, além dos pequenos lactentes, crianças desnutridas e também aquelas com perda fecal elevada, cujo cuidador seja incapaz de tratar da criança com sucesso no domicílio (MENDES; RIBEIRO; MENDES, 2013).

No Brasil, estudos demonstram que a taxa de incidência de diarreia infantil varia entre 3-12 episódios/criança/ano, a depender da região estudada, e que tais taxas de incidência são mais altas entre crianças menores de dois anos de idade. Fatores associados com a ocorrência de diarreia infantil no Brasil incluem: viventes na Região Norte/Nordeste, desmame precoce, sexo masculino, desnutrição, baixo poder aquisitivo das famílias, mãe adolescente e/ou com baixo nível educacional (FIOCRUZ, 2008; FRANÇA *et al.*, 2001; GUERRANT *et al.*, 1990; LIMA; GUERRANT, 1992; MELO *et al.*, 2008). Em 2010, foram gastos com os internamentos das crianças brasileiras com diarreia aproximadamente R\$ 9,8 milhões para aquelas menores de um ano de idade e R\$ 23,5 milhões para aquelas entre um e quatro anos de idade (MENDES; RIBEIRO; MENDES, 2013).

No presente estudo transversal, no período compreendido entre Maio/2008 e Abril/2009, descrevemos as condições gerais apresentadas pelas 226 crianças recrutadas, com idade entre 0-36 meses de idade, residentes da área urbana de Fortaleza, atendidas em âmbito hospitalar devido à diarreia. E em particular, avaliamos a prevalência de *Campylobacter* spp. – tendo sido a detecção do micro-organismo realizada tanto por cultivo microbiológico, ELISA e técnicas moleculares (PCR e RT-PCR) – e determinado um perfil de genes associados à virulência de *Campylobacter jejuni*, a espécie mais prevalente nas campilobacterioses em todo o mundo (CDC, 2013b; MAN, 2011).

Com relação às características gerais sobre as crianças recrutadas, como as condições sociodemográficas, tivemos que 93,8% (212/226) das crianças residiam em casas com água

encanada. A cidade de Fortaleza apresenta, segundo dados do Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE), 93,3% de seus domicílios ligados à rede geral de água (IPECE, 2012a) sendo, portanto, a proporção encontrada no presente trabalho bastante similar. O mesmo informe do IPECE ressalta ainda as condições gerais dos domicílios da cidade de Fortaleza no ano de 2010, a saber: 98,7% dos domicílios apresentavam cobertura da coleta de lixo, 99,7% apresentavam energia elétrica, 98,6% possuíam sanitário de uso exclusivo e, contudo, somente 59,6% dos domicílios estava ligado à rede geral de esgoto (IPECE, 2012a). Segundo dados do censo brasileiro de 2010, existiam em Fortaleza 125.514 domicílios com esgoto a céu aberto (IBGE, 2013).

Sobre o rendimento mensal das famílias, temos que 63,3% (143/226) dos responsáveis indicaram um rendimento inferior a 250 dólares mensais, sendo que, no total, aproximadamente 47% (106/226) dos responsáveis pelas crianças indicaram um rendimento familiar mensal inferior aos salários mínimos vigentes na época de recrutamento (R\$415,00 em 2008 ou R\$465,00 a partir de 1º de fevereiro de 2009) (ASSOCIAÇÃO COMERCIAL DE SÃO PAULO, 2012). Mahendraker *et al.* (1991), na Índia, reportaram que as doenças diarreicas foram cerca de 10 vezes mais frequentes entre as classes sociais mais baixas. Em 2013, foi demonstrado que em Jakarta, na Indonésia, a pobreza exerce seu efeito no aumento da prevalência de diarreia por meio de pior qualidade dos alimentos e falta de higiene domiciliar (SIMA; NG; ELIMELECH, 2013).

A educação materna é importante para a prevenção das doenças diarreicas nos filhos, assim como no estabelecimento de cuidados corretos quando os episódios ocorrem (MOAWED; SAEED, 2000). No presente trabalho, mais da metade das mães (57,1%; 128/224) tiveram até oito anos de estudo formal, o que equivale ao ensino fundamental incompleto ou completo, sendo 12,9% (29/224) as mães que possuíam de um a quatro anos de educação formal. Segundo os dados do censo brasileiro de 2010, mais de 131 mil pessoas não possuem nenhuma instrução escolar em Fortaleza, ou seja, 7% da população. Fortaleza ocupa a terceira colocação em números absolutos de analfabetos entre as capitais brasileiras (IPECE, 2012b).

Em um trabalho recente realizado na Nigéria, foi encontrado um maior risco de se contrair doença diarreica nas crianças cujas mães não tiveram educação formal e/ou não mantiveram a amamentação exclusiva (YLGWAN; OKOLO, 2012). Na Índia, foi relatado que a incidência de diarreia foi inversamente proporcional à escolaridade materna, atingindo 42% das crianças cujas mães eram analfabetas, 33% das crianças cujas mães frequentaram o ensino primário, 10,5% das crianças cujas mães concluíram o ensino médio, e 5,3% das

crianças cujas mães alcançaram o ensino superior (MAHENDRAKER *et al.*, 1991). A baixa escolaridade materna também está associada com o desmame precoce das crianças (AHMED *et al.*, 1994).

A OMS preconiza que o aleitamento materno exclusivo ocorra até, no mínimo, os seis meses de idade da criança, e que somente após seis meses de vida se dê a introdução de alimentação complementar. Em revisão sistemática recente foi verificado que crianças que são amamentadas exclusivamente por seis meses vivenciam menor morbidade por infecção gastrointestinal do que aquelas que são somente parcialmente amamentadas a partir de três ou quatro meses (KRAMER; KAKUMA, 2012). O desmame precoce aumenta o risco de doenças infecciosas gastrointestinais, além de interferir negativamente no estado nutricional da criança e, possivelmente, em seus hábitos alimentares futuros (AGOSTINI; BASELLI; MAZZONI, 2013; DISANTIS *et al.*, 2011; SALDIVA *et al.*, 2011). Estudos observacionais indicaram que o aleitamento materno, em relação à alimentação com leite em pó industrializado (fórmula), reduz o risco de obesidade na idade escolar em cerca de 20%, mesmo após o ajuste para fatores biológicos, sociais e demográficos. Além disso, a amamentação exclusiva é constantemente associada a um melhor desenvolvimento neurológico até início da idade adulta (AGOSTINI; BASELLI; MAZZONI, 2013).

Em um trabalho da Escola Nacional de Saúde Pública, os autores demonstraram que tanto as crianças em aleitamento materno exclusivo quanto as crianças amamentadas até nove a doze meses de vida – observadas em vários municípios brasileiros – apresentaram menores taxas de internação por doenças diarreicas em hospitais financiados pelo SUS quando comparadas com crianças que não eram amamentadas, o que evidencia o papel dessa prática na redução das internações por diarreia e presumivelmente na mortalidade infantil por diarreia (BOCCOLINI; BOCCOLINI, 2011).

A base para o efeito positivo da amamentação, não somente relacionado ao maior bem estar físico, como também benefícios posteriores que incluem melhor desenvolvimento cognitivo e desempenho escolar, parece estar associado ao grau de influência da amamentação nos laços afetivos entre mãe e filho, facilitados pela secreção de ocitocina pela mãe. Alternativamente, o fator crítico pode estar relacionado à grande variedade de agentes nutricionais e neurotróficos presentes no leite materno, e não em qualquer substituto dele. Ao examinar a lista dessas substâncias detectadas no leite materno fresco [Gorduras; Aminoácidos como N-acetilglucosamina, um gangliosídeo cerebral; Peptídeos como o fator de crescimento epidérmico (EGF), insulina, fator de crescimento neural, peptídeo indutor do sono delta; Aminoácidos como taurina, glutamina, carnitina; Hormônios como tiroxina,

cortisol e prolactina], é surpreendente o valor adicional do leite materno, que facilita o máximo neurodesenvolvimento infantil (EIDELMAN, 2013).

Ainda, especificamente para as campilobacterioses infantis, foi demonstrado que fucosiloligosacarídeos do leite materno humano inibiram a colonização de *C. jejuni* tanto *in vivo* (em camundongos) como *ex vivo* (mucosa humana intestinal) (RUIZ-PALACIOS *et al.*, 2003).

No presente estudo, o aleitamento materno foi um dos critérios de exclusão do estudo, o que nos impede de avaliar a influência dessa variável na duração/gravidade da doença ou mesmo na presença de algum patógeno em particular. No entanto, demonstramos que, dentre as crianças estudadas, houve um número expressivo de 42 crianças menores de seis meses de idade cujos responsáveis reportaram que o tipo de alimentação não incluía o aleitamento materno. Publicação recente do Ministério da Saúde (2010) apontou que a prevalência de crianças menores de seis meses em amamentação exclusiva em Fortaleza, no ano de 2008, foi de 32,9% - valor inferior à prevalência nacional para o mesmo ano, de 41% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Quanto às características da doença apresentada, observamos que a maioria das crianças apresentou diarreia aguda, definida como diarreia com duração inferior a 14 dias, sendo a média da duração da diarreia até o dia de atendimento de 4,0 dias ( $4,04 \pm 3,3$ ); sendo a variação entre um dia até 28 dias de duração. Quanto ao número de evacuações, foi constatado que em média, as crianças apresentaram 5,5 evacuações/dia. Ainda com relação à duração da doença diarreica, tivemos 25 casos de diarreia do tipo ProD (episódios prolongados de diarreia aguda: com duração entre 7 e 13 dias) (11,3%, 25/221) e sete casos de diarreia persistente (com duração superior a 14 dias) (3,2%, 7/221) (GUERRANT *et al.*, 2001; MANDEVILLE *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2010).

Moore *et al.* (2010) demonstraram que mesmo a diarreia do tipo ProD constitui um importante indutor de morbidade nas doenças diarreicas, aumentando o risco de entrada da criança no ciclo vicioso diarreia desnutrição, também conhecido como “complexo desnutrição-infecção”, o qual prediz que a desnutrição gera infecções intestinais mais impactantes e essas, por conseguinte, limitam a capacidade absorptiva intestinal, contribuindo para o déficit nutricional (CHEVALIER; DELPEUCH; MAIRE, 1996; GUERRANT *et al.*, 1992; 2008; WALKER *et al.*, 2007). Os dados indicam, portanto, que ocorreram casos tanto de diarreia ProD como de diarreia persistente no presente estudo, podendo essas apresentações da doença constituírem-se em causas potenciais de comprometimento físico e

cognitivo das crianças da área urbana de Fortaleza (ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011; LIMA *et al.*, 1992, 2000; NIEHAUS *et al.*, 2002; PATRICK *et al.*, 2005).

Assim, revisando o perfil da população estudada, denota-se que estratégias de intervenção para controlar os episódios de diarreia na infância precisam de uma abordagem integrada com o objetivo de aumentar o conhecimento das mães sobre a doença, evitando assim que ocorram casos similares aos discutidos acima, para os quais o auxílio médico só foi buscado após a instalação de diarreia ProD ou ainda diarreia persistente.

Em relação aos achados laboratoriais, com a utilização das técnicas microbiológicas clássicas de diagnóstico de enteropatógenos, ocorreu detecção de patógenos bacterianos em 23,5% (53/225) das amostras examinadas.

*Campylobacter* sp. foi encontrado em 8,9% (20/225) das amostras. Dados nacionais sobre a infecção por *Campylobacter* sp. relataram as seguintes prevalências de *Campylobacter* sp. em amostras de crianças com diarreia no Brasil: 2,0% (SOBEL *et al.*, 2004); 2,4% (MORENO *et al.*, 2010); 5,0% (MEDEIROS *et al.*, 2001; TOPOROVSKI *et al.*, 1999); 7,5% (PALMA *et al.*, 1997); 9,0% (MANGIA *et al.*, 1993) e 11,2% (MENDES *et al.*, 1987). Com exceção do trabalho de Moreno *et al.* (2010) todos os outros são reportes da situação do Sudeste brasileiro. Considerando, portanto, a variação reportada na literatura sobre dados nacionais – entre dois e 11% – a prevalência encontrada com os métodos baseados em coprocultura para *Campylobacter* sp. em nosso trabalho (8,9%) é consistente.

Ainda, dentre esses mesmos estudos, foi demonstrado que 75% dos achados de *Campylobacter* sp. ocorreram em crianças menores de dois anos de idade (MEDEIROS *et al.*, 2001). No presente estudo foram incluídas somente crianças de 0-3 anos de idade, e, dentre essas, o diagnóstico microbiológico sugestivo de *Campylobacter* sp. ocorreu predominantemente nas crianças mais jovens, sendo 95% (19/20) de crianças até 24 meses de idade ou 65% (13/20) em crianças menores de 12 meses. Medeiros *et al.* (2001) ainda demonstraram que *Campylobacter* sp. foi mais encontrado que *Salmonella enterica*, dado também reportado no presente estudo.

Comparando nossos achados sobre o isolamento de micro-organismos com um estudo coorte ocorrido na Amazônia peruana envolvendo 442 crianças de 0 a 72 meses de idade, notamos que, utilizando diagnóstico microbiológico, foi encontrado um percentual de *Campylobacter* sp. em amostras diarreicas muito similar ao encontrado no presente estudo (8,3%; 306/3667). Ainda, nesse mesmo estudo coorte, outro achado similar: *Campylobacter* sp. também foi isolado nas amostras diarreicas tão frequentemente quanto *Shigella* sp. (LEE *et al.*, 2013).



Métodos de isolamento para os patógenos ditos clássicos, *C. jejuni* e *C. coli*, a partir de amostras clínicas costumam ser eficazes, com algumas ressalvas. As principais características desses micro-organismos são compreendidas, permitindo o crescimento e a seleção; e quanto maior o número de micro-organismos em uma amostra clínica, mais simples será sua recuperação. O uso disseminado de temperaturas de crescimento entre 42°C explora a natureza termotolerante de *C. jejuni* e *C. coli*, promovendo o seu crescimento e reprimindo outras espécies bacterianas. Da mesma forma, as combinações de antibióticos em meios seletivos e suas concentrações evoluíram ao longo do tempo, deixando a coprocultura para *C. jejuni* e *C. coli* bastante eficiente (ON, 2013). No entanto, as amostras clínicas que requerem longos períodos de transporte antes da análise podem ter a recuperação do micro-organismo comprometida devido ao estresse sofrido e possível entrada dos micro-organismos no estado ‘viável não cultivável’ (JACKSON *et al.*, 2009). Uma solução possível seriam os procedimentos, ainda em fase de estudo, utilizando aumentos periódicos de temperatura para ajudar a adaptação e a recuperação dos micro-organismos (ON, 2013).

Os parâmetros clínicos apresentados pelas crianças, de acordo com as respostas dos responsáveis, podem ser assim resumidos: os parâmetros mais frequentes foram febre (75%, 170/225) e vômito (72%, 162/225), seguidos de dor abdominal em 68% dos casos (154/225) e sangue nas fezes em 21% das crianças (58/225). Assim como no trabalho de Mota *et al.* (2010), o parâmetro clínico diarreia com sangue foi mais comum entre as crianças com diagnóstico microbiológico de *Shigella* sp. (65%, 13/20), e *Campylobacter* sp. foi o segundo agente mais encontrado dentre as crianças que apresentaram diarreia com sangue (30%; 6/20).

Dando seguimento aos testes laboratoriais realizados, após a averiguação da qualidade das amostras de DNA extraído e detecção do controle interno (gene *rrs*), partiu-se para a detecção molecular. A combinação das leituras espectrofotométricas e amplificação do controle interno (gene *rrs*) refletiram a utilidade das amostras extraídas para o ponto final de utilização, ou seja, a detecção molecular. Nossos dados demonstraram que o DNA extraído a partir de amostra fecal regular (200 mg) ou a partir dos *swabs* não foram diferentes e ambos os tipos de amostra resultaram em quantidade e qualidade satisfatórias de DNA para o emprego na detecção molecular de agentes patogênicos. Tal avaliação (averiguação de quantidade e qualidade por leitura espectrofotométrica e detecção de gene controle interno) pode ser de grande importância em estudos nos quais uma grande proporção de amostras não possua a quantidade estabelecida para realizar o método de extração regular. No presente estudo em particular, aproximadamente 29% (65/226) das amostras diarreicas não seria

diagnosticada pelos métodos moleculares, caso a extração com swab não tivesse sido empregada.

Ainda, com relação aos processos iniciais pré-testes moleculares, temos que a quantidade mínima de DNA utilizada por teste (4 ng) foi muito superior ao mínimo requerido para detecção de *Campylobacter* sp. por PCR (0,06 pg, descrito para DNA obtido de cultura pura) (OYOFO *et al.*, 1992). Além disso, a detecção do controle interno (gene *rrs*) em todas as amostras de DNA garantiu a existência de DNA genômico passível de amplificação.

Nos ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes *hipO* (de *C. jejuni*) e *ask* (de *C. coli*), foram detectados *C. jejuni* em 19,5% (44/226) das amostras e *C. coli* em 1,3% (3/226) das amostras. Também pela utilização de métodos baseados em PCR, foi descrito um predomínio marcante de *C. jejuni* em amostras fecais de crianças com diarreia em Vellore, sul da Índia (RAJENDRAN *et al.*, 2012) e no norte do Líbano (DABOUSSI *et al.*, 2012). Dentre as amostras positivas, ocorreu co-infecção em uma amostra perfazendo um total de detecção molecular para *C. jejuni* ou *C. coli* de 20,3% (46/226). Co-infecção com *C. jejuni* e *C. coli* em uma proporção diminuta de casos também foi descrita em trabalho anterior realizado com crianças da área urbana de Fortaleza (QUETZ *et al.*, 2010) e por Rajendran *et al.* (2012).

Nossas reações de PCR *in house* para a detecção de *C. jejuni/C. coli* apresentaram, conforme determinado anteriormente, as seguintes medidas de acurácia: 31,7% de VPP (valor preditivo positivo), 98,9% de VPN (valor preditivo negativo), 81,8% de sensibilidade e 90,1% de especificidade (QUETZ *et al.*, 2012). Os valores obtidos no presente trabalho (PCR para detecção de *C. jejuni*) foram: VPP = 29,2%; VPN = 98,9%; 85,0% de sensibilidade e 86,8% de especificidade. Apesar de ter apresentado a menor sensibilidade quando comparada com RT-PCR e ELISA; quando comparados com a cultura microbiológica, o teste PCR para detecção de *C. jejuni* obteve maior acurácia que os testes ELISA e RT-PCR e também obteve o maior VPP, o que confirma a maior especificidade da PCR em relação aos demais, no contexto do presente estudo (**Tabela 11**), visto que os iniciadores utilizados para o teste por RT-PCR deixaram margem à detecção de outras espécies de *Campylobacter* sp. (discussão mais aprofundada adiante). Ainda, os erros na medição da sensibilidade e especificidade de um determinado teste irão surgir principalmente se o teste "padrão ouro" em si não tem 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, o que não constitui um caso raro dentre as doenças infecciosas (BANOO *et al.*, 2006), nem dentre as campilobacterioses (OMS, 2001).

Com relação às taxas encontradas para a detecção molecular de *C. jejuni*, estudos anteriores demonstraram o aumento da taxa de detecção de *Campylobacter* sp. por métodos

moleculares, quando em comparação com métodos baseados em cultura (INGLIS; BORAS; HOUDE, 2011; MAHER *et al.*, 2003;. SINGH *et al.*, 2011; SINHA *et al.*, 2004). Tais estudos sugerem que métodos baseados em cultura podem subestimar a prevalência de infecções por *Campylobacter* sp. e que os métodos baseados em PCR seriam mais eficazes para sua detecção (MAHER *et al.*, 2003;. SINGH *et al.*, 2011). Inglis, Boras e Houde (2011), pela utilização de métodos moleculares, revelaram que 12,2% e 4,3% de infecções por *C. jejuni* e por *C. coli*, respectivamente, não obtiveram detecção pelos métodos de identificação baseados em cultura. Na Índia, um estudo que avaliava casos de Síndrome de Guillain-Barre precedidos por infecção por *C. jejuni* demonstrou que a taxa de detecção de *Campylobacter* sp. utilizando ferramentas moleculares atingiu 19% de identificação, ao contrário da taxa de detecção de 5%, utilizando coprocultura (SINHA *et al.*, 2004). No Japão, foram encontradas sequências de DNA de *C. jejuni* nas fezes de um indivíduo com enterite infecciosa no 3º dia da doença, enquanto a coprocultura realizada com a mesma amostra foi negativa (NAKAMURA *et al.*, 2008).

Uma explicação plausível para tal diferença de taxas de detecção entre as técnicas de microbiologia convencional e as técnicas moleculares é a de que a coprocultura para detecção de *Campylobacter* sp. apresenta algumas limitações significativas, a saber: o micro-organismo é exigente e pode atingir o estado conhecido como ‘viável não-cultivável’ com a ocorrência de variações de pH, teor de umidade, temperatura, teor de nutrientes e salinidade (JACKSON *et al.*, 2009).

Por outro lado, a dificuldade de se obter alta sensibilidade no teste reconhecido como padrão-ouro para a causa microbiológica de infecção intestinal por *Campylobacter* sp. (visto que a coprocultura pode sofrer influência das variáveis ambientais descritas acima) enfraquece o significado clínico das detecções moleculares. O conhecimento convencional é o de que deve haver um agente causal principal para a doença diarreica em curso, porém esse paradigma tem sido desafiado pelo aumento da detecção de infecções mistas pelos métodos moleculares (PLATTS-MILLS; OPERARIO; HOUP, 2012; SINHA *et al.*, 2013). Assim, a incorporação bem sucedida de diagnóstico molecular para doenças diarreicas em geral, e para as campilobacterioses em particular, exigirá tanto uma compreensão cuidadosa dos aspectos técnicos quanto uma avaliação de aspectos clínicos, epidemiológicos e imunológicos.

Os aspectos imunológicos mencionados a pouco apresentam grande importância principalmente nos países em desenvolvimento. Havelaar *et al.* (2009) sumarizaram o conhecimento vigente sobre a resposta imune inata e adaptativa montada pelo hospedeiro contra *C. jejuni*. Com relação à imunidade inata, experimentos *in vitro* indicam que *C. jejuni*

estimula a produção de beta-defensinas que apresentam efeito bactericida direto pela ruptura da parede celular bacteriana. Além disso, *C. jejuni* regula positivamente quimiocinas e citocinas essenciais para as respostas pró-inflamatórias e o recrutamento de fagócitos. *C. jejuni* é ingerido e eliminado pelos fagócitos profissionais em extensão variável, a depender das diferentes espécies de hospedeiros. Já a imunidade específica parece contribuir para a limitação da doença por *C. jejuni* e leva ao desenvolvimento de imunidade protetora, hipótese suportada pelos relatos de infecções graves e persistentes por *C. jejuni* em indivíduos agamaglobulinêmicos e com outras formas de comprometimento da resposta imune. Além disso, os relatos de doença sistêmica por espécies de *Campylobacter* sp. são majoritariamente descritos em indivíduos imunocomprometidos (HAVELAAR *et al.*, 2009).

A resposta imune inata e adaptativa, portanto, possui papel incontestável na resolução da infecção por espécies do gênero *Campylobacter* (TRIBBLE *et al.*, 2010). É provável ainda que ocorra uma proteção contra a doença clínica adquirida em indivíduos mais velhos após exposições repetidas (QUINLAN, 2013) e, a implicação para os estudos epidemiológicos nos países em desenvolvimento dessa proteção contra *Campylobacter* sp. é que o contato frequente com fontes de infecção (por hábitos alimentares peculiares ou decorrente das condições higiênicas precárias) torna comum a ocorrência de portadores que, apesar de não estarem necessariamente doentes, contribuem com a manutenção da endemicidade do patógeno (PLATTS-MILLS; OPERARIO; HOUPPT, 2012).

No presente estudo, a idade baixa das crianças recrutadas nos leva a pensar em infecção primária, embora seja impossível definir precisamente tal informação com o tipo de estudo observacional aqui realizado.

Um estudo que potencialmente ajudará a elucidar a questão sobre a idade comum de ocorrência da primeira infecção por *C. jejuni* em nosso meio é o estudo coorte em andamento no Instituto de Biomedicina do Semiárido Brasileiro da Universidade Federal do Ceará (IBISAB/UFC), o Projeto Mal-ED, sítio Fortaleza. Os dados parciais computados no período compreendido entre 2010-2012 – provenientes da avaliação de crianças, residentes na área urbana carente de Fortaleza, acompanhadas mensalmente desde o nascimento até os 24 meses de idade – nos permitem fazer algumas considerações (MAL-ED, 2012).

Análises iniciais do Projeto Mal-ED em Fortaleza demonstram que 8,6% (197/2.297) das amostras fecais coletadas foram positivas por ELISA para detecção de antígenos de superfície de *C. jejuni/C. coli*, o equivalente a 58,5% (113/192) crianças com diagnóstico imunoenzimático positivo em pelo menos um momento do estudo (coletas mensais de amostras fecais realizadas entre os meses 1-12 e ainda nos meses 15, 18, 21 e 24, totalizando

16 avaliações/criança). Dentre os indivíduos recrutados, as positivities iniciais para *C. jejuni/C. coli* ocorreram em média no sétimo mês de vida (média = 7,3 meses; d.p.= 3,83; mediana= 7; mínimo= 1 mês; máximo= 23 meses). Uma porcentagem expressiva dessas crianças teve a primeira detecção antes dos 12 meses de idade (88,5%; 100/113), sendo ainda mais intrigante o fato de que tal detecção ocorreu ainda no primeiro mês de vida em 5,3% (6/113) dos casos.

Ainda em relação aos dados preliminares do estudo Mal-ED, foi relativamente comum a ocorrência de detecção continuada (38,9%, 44/113) – ou seja, uma mesma criança apresentou amostras positivas para *C. jejuni/C.coli* em diferentes meses do estudo (por vezes contíguos) – durante as avaliações mensais de presença de enteropatógenos.

Características da infecção por *Campylobacter* sp. permitem inferir que algum percentual de indivíduos em processo de recuperação apresentem diagnóstico positivo, principalmente o diagnóstico molecular e/ou imunoenzimático, por serem esses mais sensíveis que o diagnóstico baseado em cultura. Tais características incluem a duração média da doença (dois a sete dias) e o período de duração da excreção de *Campylobacter* sp. nas fezes, que ocorre entre sete e 21 dias após a ingestão do micro-organismo (WYSOK; URADZINSKI, 2009). Em indivíduos sem tratamento, a excreção de *Campylobacter* sp. pode persistir por até três meses (RUIZ-PALACIOS, 2007). Tais indivíduos excretadores saudáveis ou em período de convalescença podem ser considerados como “reservatórios”, contribuindo para novas infecções (PAZZAGLIA *et al.*, 1991).

Levine e Robbins-Browne, recentemente, tentaram sumarizar as causas relacionadas com os patógenos e com o hospedeiro para a excreção de enteropatógenos em indivíduos sem diarreia (LEVINE; ROBINS-BROWNE, 2012). Estudos de infecção experimental em voluntários adultos saudáveis, que foram desafiados com cepas de *C. jejuni* revelaram que algumas cepas causam diarreia mais facilmente do que outras, sendo que algumas cepas apresentaram baixa patogenicidade. Além disso, dentre as cepas causadoras de diarreia, a duração, gravidade e sintomas variaram amplamente. Assim, parece existir heterogeneidade entre as cepas que estão em circulação na população humana, com algumas cepas mais propensas a causar doença do que outras (BLACK *et al.*, 1988).

Atributos de virulência ou outras características que sejam exclusivas das cepas diarreio gênicas ainda não foram encontrados, e até que tais características sejam identificadas de forma inequívoca – para uma possível diferenciação eficaz das cepas altamente patogênicas das cepas inócuas ou com baixo grau de patogenicidade – a variabilidade entre indivíduos relacionada à apresentação da doença não poderá ser unicamente atribuída nem à

variabilidade das cepas circulantes nem à uma variabilidade individual ou circunstancial de cada hospedeiro (LEVINE; ROBINS-BROWNE, 2012).

Outra possibilidade para avaliar especificamente a utilidade do diagnóstico molecular e imunoenzimático para as enterites causadas por *Campylobacter* sp. seria a realização de pesquisa de anticorpos anti-*Campylobacter* no soro, como proposto anteriormente (STRID *et al.*, 2001). Tal trabalho avaliou IgG, IgM e IgA em 631 soros de 210 pacientes com campilobacteriose e adicionalmente, em 164 soros de um grupo controle para determinar o ponto de corte (*cut off*). Strid *et al.* obtiveram alta sensibilidade com a combinação dos níveis encontrados para as três imunoglobulinas (90%) e ainda, com o acompanhamento dos pacientes, demonstraram que os níveis de IgG anti-*Campylobacter* ainda seguia elevada 4,5 meses após a infecção, enquanto os anticorpos IgA e IgM estiveram elevados durante a fase aguda da infecção, mas ainda até dois meses após o início da infecção.

Análises mais aprofundadas sobre a existência de infecções múltiplas nos casos do Projeto Mal-ED descritos acima, ou ainda, sobre a relação entre diagnóstico positivo de *Campylobacter* sp. e desnutrição – relação evidenciada na América do Sul nos últimos seis anos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; QUETZ *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2013) e também na Índia (GUPTA *et al.*, 2011) – ainda estão em andamento. Além disso, a detecção molecular de *C. jejuni* e de outros patógenos nas amostras do estudo Mal-ED será realizada por PCR-Luminex, pela utilização dos protocolos descritos por Liu *et al.* (2011, 2012), e muito provavelmente tais testes auxiliarão nas avaliações sobre a utilidade clínica dos diagnósticos moleculares e imunoenzimáticos.

Voltando aos achados do presente estudo, a taxa de detecção de *C. jejuni* ou *C. coli* encontrada por PCR (20,3%; 46/226), é comparável a vários outros estudos que diagnosticaram a infecção por *Campylobacter* sp. em casos de diarreia infantil, a saber: 7% no Teerã e no Paquistão (JAFARI *et al.*, 2009; SOOFI *et al.*, 2011); 9,7% em Madagascar (RANDREMANANA *et al.*, 2012); 11% no norte do Líbano (DABOUSSI *et al.*, 2012); 14,3% no Uruguai (MOTA *et al.*, 2010); 17,2% no Egito (PAZZAGLIA *et al.*, 1995); 30,8% no Canadá (KABORÉ *et al.*, 2010); e até mesmo 52% em crianças de até 4 anos na Bulgária (IVANOVA *et al.*, 2010).

Em contraste, trabalho recente que diagnosticou *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de crianças com e sem diarreia por diagnóstico molecular em Belo Horizonte, Minas Gerais (SILVA, 2012), apresentou taxas bastante inferiores às encontradas no presente estudo, em torno de 2,2%. Tal diferença pode ser explicada pelos contrastes socioeconômicos – trazidos à reflexão pela Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde – entre as regiões

brasileiras Sudeste e Nordeste (FIOCRUZ, 2008). Resumidamente, tal comissão demonstrou que o número de óbitos por diarreia foi quatro vezes maior na região Nordeste quando comparado à região Sudeste, evidenciando diferenças regionais quanto ao acesso e à qualidade da atenção à saúde, e possivelmente também quanto ao número de casos de diarréia infecciosa (FIOCRUZ, 2008). Podem ainda ser aludidas diferenças experimentais (ON, 2013; ON *et al.*, 2013).

Em suma, na América do Sul, as prevalências de isolamento de *Campylobacter* sp. em crianças com diarreia variou entre 2,3% e 23,0%, de acordo com a revisão de Fernández (2011).

Bessède *et al.* (2011), na França, trabalho o qual ainda retomaremos a discutir adiante, demonstraram a necessidade de ser reavaliada a forma de diagnóstico de *Campylobacter* sp., sendo considerados resultados positivos aqueles cujo diagnóstico microbiológico foi dado e, para as amostras sem cultura positiva, aqueles resultados simultaneamente positivos por pelo menos um método molecular e um imunoenzimático simultaneamente. Por essa classificação, e pela análise da **Tabela 8**, teríamos uma prevalência final um pouco menor, de 16,4% (37/226), mas ainda comparável aos estudos mencionados nos parágrafos anteriores.

A importância da presença de *C. jejuni/C.coli* na população infantil de Fortaleza ainda necessita de estudos de maior abrangência. Isso porque, além do episódio de diarreia nas crianças acometidas – sendo os parâmetros clínicos mais comuns aqui descritos na campilobacteriose, a dor abdominal, a febre e os vômitos – houve, ainda que não mensurada, a geração de custo durante o atendimento/internação para o sistema hospitalar e para a família.

Apenas na cidade de Fortaleza, o custo que o Sistema Único de Saúde computou para as internações por diarreia e gastroenterite de origem infecciosa presumível, para crianças menores de quatro anos de idade, foi de R\$ 71.213,63 para o período compreendido no presente estudo (março/2008 a abril/2009) (DATASUS, 2013). Ainda, tal custo computado para o Brasil, no mesmo período, foi de R\$ 28.905.507,93 (DATASUS, 2012b). Por extrapolação, contando que a prevalência de 16,4% para as infecções por *Campylobacter* sp. encontrada em nosso trabalho [de acordo com a classificação de Bessède *et al.* (2011); ver discussão mais aprofundada adiante], seja representativa da população infantil brasileira, o valor total estimado para internações decorrentes de infecção intestinal por *Campylobacter* sp. em Fortaleza teria sido de aproximadamente R\$ 11,6 mil no período de março/2008 a abril/2009 e de R\$ 4,74 milhões no mesmo período em âmbito nacional.

O custo para as famílias é de difícil contabilização e seu cálculo extrapola os objetivos do presente trabalho, mas, é plausível que as mesmas tenham tido de arcar com o custo do deslocamento até a unidade de atendimento, com o maior número de fraldas gastas, com a mudança na rotina alimentar da criança e possível falta ao trabalho, além de, quando aplicável, gastos com a medicação prescrita.

Rheingans *et al.*, em dois trabalhos distintos, sendo um na África (2012a) e outro na Ásia (2012b), demonstraram que as famílias se depararam com uma carga econômica substancial devido à diarreia infantil. O custo total médio de todos os episódios considerados variou de \$ 2.63 na Gâmbia a \$ 6.24 no Quênia, no estudo africano, e \$ 1.82 em Bangladesh a \$ 6.47 no Paquistão (Ásia). Tais valores, embora sejam de pequeno valor em termos absolutos, podem ser substanciais em relação à renda de famílias pobres resultando em cuidados reduzidos e agravamento do quadro de saúde das crianças, o que pode ser exemplificado pelo seguinte achado do trabalho africano: dentre as famílias que não buscaram atendimento médico para suas crianças, cerca de 40% alegaram que os custos com transporte seriam altos demais para o orçamento familiar. Além disso, os episódios diarreicos são frequentes em crianças menores de cinco anos de idade, o que implica que essas despesas podem precisar ser efetuadas regularmente (RHEINGANS *et al.*, 2012a, 2012b).

Ainda, além do ônus imediato descrito acima, segundo dados recorrentes da literatura médica, os indivíduos apresentam um risco variável de sofrerem sequelas pós-infecção por *C. jejuni*, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (KALRA *et al.*, 2009; NYATI; NYATI, 2013), a artrite reativa (WYSOK; URADZINSKI, 2009) e a Doença do Intestino Inflamado (GRADEL *et al.*, 2009a). A ocorrência das sequelas pós-infecção parece depender de variáveis ainda em avaliação, como a susceptibilidade genética dos indivíduos (NIELSEN; STEFFENSEN; EJLERTSEN, 2012). Nielsen, Steffensen e Ejlertsen, em 2012, associaram a ocorrência de polimorfismos nos genes que codificam IL-18 e INF-gamma com o risco de desenvolvimento de artrite reativa na Dinamarca. Outros autores, no entanto, sustentam que variações nas cepas bacterianas são responsáveis pelo desencadeamento das sequelas (ZHANG *et al.*, 2010).

Gradel *et al.* (2009) na Dinamarca, após 15 anos de acompanhamento em um estudo coorte, demonstraram que houve um risco aumentado de ocorrência de Doença do Intestino Inflamado em indivíduos com registros laboratoriais prévios de enterite por espécie de *Campylobacter* (GRADEL *et al.*, 2009a). Com relação à Síndrome de Guillain-Barré, Kalra *et al.* (2009) concluíram que mesmo infecções subclínicas por *C. jejuni* foram importantes antecedentes de SGB na população infantil indiana.



Na Nova Zelândia, foi realizado um estudo sobre campilobacteriose e SGB no período compreendido entre 1988-2010. Durante esse período, a partir do ano de 2006, ocorreram intervenções regulatórias bem sucedidas com o intuito de diminuir a contaminação da carne de frango por *Campylobacter* sp. Os dados finais do trabalho demonstraram que, após três anos de intervenções regulatórias, as notificações de campilobacteriose declinaram em 52% e que tal declínio foi acompanhado pela diminuição de 13% dos casos de internações por SGB; concluindo assim que a incidência de uma doença infecciosa aguda, a enterite por *Campylobacter* sp., pode influenciar a incidência de uma condição neurológica grave, a SGB (BAKER *et al.*, 2012).

Mundialmente, estima-se que a SGB e outras complicações ocorram a uma taxa de aproximadamente 1/1.000 infecções por *C. jejuni* (ALLOS, 2001).

No Brasil, entre os anos de 1990 e 1996, a incidência anual de SGB foi de 0,4 a 0,6 casos/100.000 habitantes, em menores de 15 anos. Em um estudo na cidade de São Paulo, entre 1995 e 2002, a incidência anual foi de 0,6 casos por 100.000 habitantes (DIAS-TOSTA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2004). Em relatos de casos encontrados na literatura nacional, não existiam dados sobre a infecção prévia por *Campylobacter* sp. (BOLAN *et al.*, 2007; FERRARINI *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2007), embora doença diarreica prévia tenha sido descrita em alguns dos casos (SANTANA *et al.*, 1996). No geral, os casos da UTI pediátrica de Porto Alegre, descritos por Santana *et al.* (1996), demonstraram os seguintes parâmetros clínicos: 100% apresentaram perda de funções motoras e hipotonia, hiporreflexia em 76%, paraplegia em 52%, rigidez da nuca em 38%, dor nos membros inferiores em 14% e, 5% apresentaram perda de controle esfinteriano. Em 38% das crianças foi necessário o uso de ventilação artificial, uma delas chegando a utilizá-la por 180 dias.

Pelo exposto, portanto, o acompanhamento necessário para avaliar o risco das crianças fortalezenses, expostas às enterites causadas por *C. jejuni*, desenvolverem sequelas pós-infecção demandaria um estudo amplo e de longa duração, preferencialmente em conjunto com as modalidades clínicas de gastroenterologia, neurologia e reumatologia.

Além disso, no trabalho de Lee *et al.* (2013), foi demonstrado que a infecção por *Campylobacter* sp., tanto sintomática como assintomática, estava associada com o ganho de peso reduzido nas crianças em um período de três meses de acompanhamento. Ainda, o mesmo grupo demonstrou que os episódios mais graves de campilobacteriose foram associados com déficits maiores no crescimento linear e no ganho de peso. Tais consequências para o desenvolvimento físico também seriam importantes para uma avaliação

em longo prazo nas crianças fortalezenses, expostas às enterites causadas por *Campylobacter* sp.

As amostras positivas para *C. jejuni* (*hipO*<sup>+</sup>, 44 amostras) foram posteriormente testadas por PCR ou PCR multiplex para a avaliação da prevalência de genes de virulência de *C. jejuni*, cujos resultados foram resumidos na **Figura 12** e no **Quadro 4**.

Um perfil variado de combinação de genes de virulência foi encontrado dentre as amostras *hipO*<sup>+</sup>: 31,8% (14/44) apresentaram seis genes de virulência; cinco genes de virulência foram detectados em 52,3% (23/44); quatro genes de virulência foram detectados em 9,1% (4/44) das amostras e um mínimo de dois genes de virulência foram detectados em três amostras (6,8%).

Em acordo com nossos resultados, outros estudos sobre a prevalência de genes de virulência também encontraram uma proporção muito elevada de tais genes em diferentes tipos de amostras clínicas ou animais (AL-MAHMEED *et al.*, 2006; ANDRZEJEWSKA *et al.*, 2011; DATTA; NIWA; ITOH, 2003; HAMIDIAN *et al.*, 2011; TALUKDER *et al.*, 2008; RIPABELLI *et al.*, 2010), especialmente *ciaB* (95-98%) e o operon *cdtABC* (85-100%).

Individualmente, as prevalências encontradas para os genes pesquisados foram: 97,7% (43/44) para *racR* e *ciaB*; 95,4% (42/44) para *cdtABC*; 88,6% (39/44) para *dnaJ*; 79,5% para *flaA* (35/44) e 45,4% para *pldA*.

O elevado grau de positividade na detecção de tais genes, embora não tenha se refletido em correlação com os dados clínicos apresentados pelas crianças (**Figura 13**), pode estar relacionado com a importância das proteínas codificadas por tais genes, tanto para a colonização em diferentes habitats ecológicos (produtos dos genes *dnaJ*, *flaA* e *racR*), como para a invasão bacteriana (produto dos genes *ciaB* e *pldA*) e produção de toxinas (Toxina Citoletal Distensora, CDT, codificada pelo operon *cdtABC*).

Foram atribuídos 01 ponto aos genes cujas proteínas codificadas possuem função na colonização da bactéria (genes *dnaJ*, *flaA* e *racR*) e também para o operon *cdtABC*. Atribuímos 02 pontos aos genes que codificam proteínas relacionadas à invasão, visto que a habilidade de *C. jejuni* em causar doença está comprovadamente relacionada à sua capacidade de invadir as células epiteliais do trato intestinal (MALIK-KALE; PARKER; KONKEL, 2008). Embora sem alcance estatístico, ao atribuímos escores às detecções dos genes de virulência, ocorreu uma tendência das crianças com os maiores escores apresentarem o sinal sangue nas fezes (**Figura 13**).

Essa atribuição de escores e seu achado subsequente, ou seja, de uma tendência de encontro mais frequente dos genes *ciaB* e *pldA* nas crianças com diarreia sanguinolenta, está

em harmonia principalmente com o gene *pldA*, encontrado em somente 45% das amostras, cujo produto codificado é uma fosfolipase que pode clivar a membrana fosfolípida conduzindo à lise da membrana. A atividade hemolítica tem sido muitas vezes associada com a expressão de fosfolipases em outros patógenos bacterianos e também *Campylobacter* sp. (GRANT *et al.*, 1997).

Trabalhos mais recentes, contudo, tem-se utilizado de uma combinação muito mais ampla de genes e técnicas mais sensíveis, a fim de reavaliar isolados pertencentes às coleções caracterizadas anteriormente em perfil mínimo, a depender da capacidade técnica/estrutural vigente nos laboratórios de pesquisa (ZAUTNER *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013a).

Ainda, Al-Mahmeed *et al.* (2006), apesar de terem encontrado um perfil de genes de virulência (*cdtB<sup>+</sup>iam<sup>+</sup>*) associado à doença diarreica sintomática em sujeitos maiores de 15 anos de idade, demonstraram também um contraste com relação a tal evidência, visto que cepas *cdtB<sup>-</sup>iam<sup>-</sup>* foram encontradas em crianças menores de três anos de idade com diarreia sintomática na mesma proporção que as cepas *cdtB<sup>+</sup>iam<sup>+</sup>* e *cdtB<sup>+</sup>iam<sup>-</sup>*, o que sugere que a idade, e também outros fatores subjacentes – como a desnutrição – possam ser mais importantes na susceptibilidade para a ocorrência de manifestações clínicas do que a variabilidade das cepas circulantes.

Em casos de campilobacteriose, o mais estudado dos fatores de virulência de *C. jejuni* é CDT. Mortensen *et al.* (2011), na Dinamarca, estudaram amostras clínicas de 30 pacientes com diagnóstico confirmado de infecção por *C. jejuni*. Como objetivo das investigações, o grupo determinou o nível de expressão bacteriana de CDT *in vitro*, além dos efeitos de anticorpos neutralizantes no soro dos pacientes. Tal estratégia poderia ser útil no aprofundamento de nossos trabalhos em campilobacteriose intestinal, uma vez que observamos uma diferença na prevalência dos genes *cdtABC* entre o presente estudo (95%; 42/44) e um estudo caso-controle local anterior (57,1%; 8/14 – QUETZ *et al.*, 2010), sinalizando uma possível diferença de virulência entre as infecções por *C. jejuni* que requerem e as que não requerem atendimento médico de urgência. Tal suposição precisa de estudos adicionais para sua confirmação, com captação simultânea dos casos de campilobacteriose que precisam de atendimento médico e dos casos de diarreia que dispensam tal abordagem.

O plasmídeo *pVir*, por sua vez, codifica um sistema de secreção de tipo IV que pode afetar a virulência de *C. jejuni*. A análise da sequência parcial de *pVir* revelou a presença de sequências que codificam proteínas com certo grau de homologia com os componentes dos sistemas de secreção tipo IV. A mutação de tais genes plasmidiais reduziu tanto a adesão

como a invasão de células INT407 quando comparadas com a infecção por cepa selvagem 81-176 (isolada após um surto de enterite cuja fonte contaminante foi leite não pasteurizado). Tais estudos *in vitro* aliados à detecção dos genes plasmidiais em aproximadamente 10% dos isolados clínicos de campilobacterioses nos países desenvolvidos, levou um grupo a defender o envolvimento dos plasmídeos na virulência de *C. jejuni* (BACON *et al.*, 2000).

Não detectamos *pVir* em nenhuma das amostras *hipO*<sup>+</sup>, nem mesmo em amostras de crianças cujos responsáveis relataram ocorrência de diarreia sanguinolenta (13/44). Essa correlação, entre diarreia sanguinolenta e diagnóstico de *pVir*, foi apresentada previamente por Tracz *et al.* (2005), em Alberta, Canadá. Tal trabalho demonstrou que 53% dos pacientes infectados por cepas de *C. jejuni-pVir*<sup>+</sup> apresentaram sangue nas fezes, em contraste com apenas 12% de pacientes infectados com cepas *C. jejuni-pVir*<sup>-</sup> que apresentaram sangue nas fezes (p=0,011), dado que levou o grupo a sugerir que *pVir* fosse um marcador importante de infecção invasiva.

Em 2006, no entanto, outro grupo apresentou resultados diversos do grupo canadense. Louween *et al.* (2006), na Holanda, descreveram uma ausência de correlação entre diarreia sanguinolenta e a presença do plasmídeo *pVir*.

A ausência de *pVir* no presente trabalho pode ser explicada por características geográficas da infecção por *Campylobacter* sp., como anteriormente sugerido por Louween *et al.* (2006). O presente dado sobre a não detecção de *pVir* é importante para estudos futuros, como um marco zero, visto que o trabalho do grupo foi o primeiro a caracterizar os genes de virulência para *C. jejuni* no Brasil (QUETZ *et al.*, 2012).

Estudos adicionais serão necessários para fins de comprovação, possivelmente pelo aumento do número de genes plasmidiais a serem avaliados, além dos perfis de resistência e susceptibilidade aos antimicrobianos (quando o armazenamento da cepa isolada for possível). Técnicas mais avançadas poderiam ser empregadas, como, por exemplo, a detecção plasmidial por *microarray*, como proposto anteriormente para fins de investigação da conservação e variabilidade genética intra- e inter-espécies (FRIIS *et al.*, 2007).

Em conjunto, portanto, nossos dados sobre os genes de virulência de *C. jejuni* sugerem que, dentre os genes estudados, ocorreu variabilidade discreta entre as cepas de *C. jejuni* presentes em crianças com doença diarreica na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. Estudos futuros, principalmente do tipo caso-controle, serão necessários para avaliar se o perfil de genes de virulência apresenta papel na deflagração da doença ou em sua gravidade. A utilização de técnicas que necessitam do DNA proveniente dos isolados, como *Multilocus Sequencing Typing* (MLST), seria interessante para a determinação precisa de tal

variabilidade, inclusive contaria, em estudos ampliados, com a possibilidade de determinação da fonte contaminante (ON, 2013; SHIN *et al.*, 2013; SPROSTON *et al.*, 2010).

Atualmente existe um sítio eletrônico contendo um banco de dados de genótipos de *Campylobacter* sp. com curadoria partilhada por pesquisadores da Universidade de Oxford, Reino Unido (COLLES; MAIDEN, 2012). Atualmente tal sítio eletrônico abriga 155.870 sequências de DNA e 6.323 perfis de MLST (CAMPYLOBACTER MLST, 2013). A divulgação e utilização de tal ferramenta e a criação de interface para a inserção de sequências de todas as partes do mundo só foi possível com o advento de ferramentas de bioinformática (JOLLEY; MAIDEN, 2010).

Com relação ao conjunto de testes utilizados para diagnóstico, ocorreu, embora de forma não significativa, um predomínio de meninos dentre os casos com diagnóstico microbiológico sugestivo de *Campylobacter* sp. (0,68; razão sexo masculino/total), com diagnóstico molecular de *C. jejuni* (0,57 tanto para PCR e para RT-PCR); com diagnóstico imunoenzimático de *Campylobacter* sp. (0,62) ou ainda, com todos os quatro tipos de diagnóstico positivo (0,69; n=16).

O dimorfismo sexual em doenças infecciosas é uma situação na qual a incidência da doença é repetidamente mais relatada, na literatura científica, como mais prevalente em um gênero (MARRIOT; HUET-HUDSON, 2006). Embora seja hipotetizado que, para campilobacteriose, fatores fisiológicos desempenhem um papel importante na maior incidência no gênero masculino, diferenças comportamentais e fisiológicas têm sido sugeridas como causa do viés de gênero (STRACHAN *et al.*, 2008).

O presente estudo não apresenta o poder para avaliar o significado de se ter encontrado mais meninos dentre as crianças com algum diagnóstico para *Campylobacter* sp., pois havia, no geral, mais meninos recrutados do que meninas (0,58) (QUETZ *et al.*, 2012). No entanto, foi encontrado anteriormente em estudo africano, que dentre crianças de até 48 meses de idade, os meninos sofreram uma incidência significativamente maior de diarreia do que as meninas (4,4 episódios/ano em meninos contra 3,6 episódios/ano em meninas) (WYRSCH *et al.*, 1998). Na Índia, Mahendraker *et al.* (1991) relataram que os meninos menores de cinco anos de idade eram mais propensos a sofrerem de doença diarreica do que as meninas da mesma idade (63,2% contra 36,8%,  $p < 0,05$ ).

Por outro lado, na Guatemala, América Central, embora não tenha ocorrido diferença nas taxas de diarreia apresentadas entre os gêneros, os meninos com doença diarreica foram mais encaminhados para o atendimento médico do que as meninas, embora não se tenha aventado as razões para tal fato (DELGADO *et al.*, 1983). Ainda, o grupo de Rheingans, com

seu trabalho sobre o impacto econômico das doenças diarreicas para as famílias africanas, demonstrou que o gênero das crianças era o segundo determinante mais importante para o direcionamento dos gastos do orçamento familiar com doença diarreica infantil na Gâmbia e no Mali, sendo que, embora não tenha ocorrido diferença na frequência de diarreia moderada a grave entre meninos e meninas nesses dois países, os gastos domésticos diretos e o custo médico total para os meninos foram aproximadamente duas vezes maiores que para as meninas (RHEINGANS *et al.*, 2012a).

Segundo os autores, há duas possíveis explicações para essa associação, sendo a primeira a possibilidade de que tal discrepância reflita as diferenças na gravidade da doença diarreica entre meninos e meninas, o que resultaria na necessidade de maior cuidado para os meninos. A segunda interpretação possível é que as diferenças de alocação de recursos familiar refletem uma desvantagem de gênero para as meninas (RHEINGANS *et al.*, 2012a). De fato, alguns estudos têm documentado a menor alocação de recursos para a saúde das meninas em ambientes de baixa renda (PANDEY *et al.*, 2002; POKHREL *et al.*, 2005). Tal constatação não foi evidenciada em estudos brasileiros até o presente momento. Ao contrário, dados demonstram que as diferenças de gênero na morbidade infantil variam com a idade, sendo desfavoráveis aos meninos até os 10 anos de idade (PINHEIRO *et al.*, 2002).

Quanto aos variados percentuais de detecção de *Campylobacter* sp. obtidos com as quatro metodologias utilizadas (cultura em meio seletivo, PCR, RT-PCR e ELISA), temos que os maiores percentuais de detecção foram encontrados, respectivamente, por: ELISA (37,9%; 58/153), RT-PCR (26,7%; 60/225), PCR (20,3%; 46/226) e cultura microbiológica seletiva (8,9%; 20/225).

As características fundamentais de desempenho de um teste destinado a discriminar os indivíduos infectados e os não infectados são a sensibilidade, isto é, a probabilidade de que um indivíduo verdadeiramente infectado ter seu teste positivo, e a especificidade, isto é, a probabilidade de que um indivíduo verdadeiramente não infectado ter seu teste negativo. Tais medidas são geralmente expressas como uma percentagem e são normalmente determinadas contra um teste padrão de referência, por vezes referido como um teste "padrão de ouro" (BANOO *et al.*, 2006).

Os testes utilizados, no presente trabalho, em comparação com o cultivo microbiológico, apresentaram os seguintes valores de sensibilidade (S) e especificidade (E): S=100% e E=71,2% (ELISA); S=90% e E=79,9% (RT-PCR), e S= 85% e E=86,8% (PCR).

Duas outras importantes medidas de desempenho de testes diagnósticos são o valor preditivo positivo (VPP), ou seja, a probabilidade de que os testes positivos pelo teste sejam

de indivíduos realmente infectados, e o valor preditivo negativo (VPN), a probabilidade de que os testes negativos pelo teste sejam de indivíduos realmente não infectados. Ambas as medidas, são muitas vezes expressas em porcentagem, e dependem não só da sensibilidade e da especificidade do teste, como também da prevalência da infecção na população estudada (BANOO *et al.*, 2006). Utilizamos no presente estudo uma prevalência de 6,0% (QUETZ *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, a medição da sensibilidade e especificidade de um novo teste proposto irá depender da sensibilidade e da especificidade do teste definido como "padrão ouro", o que constitui um grande obstáculo nas doenças infecciosas em geral e também em relação às campilobacterioses (BANOO *et al.*, 2006; OMS, 2001; ON.,2013), pois no momento, é possível interpretar que as vantagens na implementação de novos métodos é evidente (LINDSAY *et al.*, 2013; M'IKANATHA *et al.*, 2012).

Em geral, para as doenças diarreicas, quando os métodos de cultura identificam o micro-organismo alvo, podemos afirmar que o mesmo é verdadeiramente presente. No entanto, um resultado negativo pode ser real, porque o micro-organismo não está presente, ou falso, por variadas razões: (i) o micro-organismo não cresceu como resultado de inibição inadvertida pelos meio seletivos escolhidos, (ii) as condições de transporte dos espécimes comprometeram a viabilidade do micro-organismo ou (iii) ocorreram ineficiências nos protocolos do laboratório executor (LINDSAY *et al.*, 2013).

A baixa sensibilidade do diagnóstico microbiológico convencional para *Campylobacter* sp. foi apontada de forma inequívoca em 2011 na França, por Bessède *et al.*, que sugeriram que as orientações para detecção de *Campylobacter* devem ser modificadas em um futuro próximo. O grupo utilizou sete testes diferentes para diagnóstico de *Campylobacter* sp. em 242 amostras de pacientes hospitalizados com doença diarreica sintomática, e, pela combinação dos resultados, destacaram os limites da cultura como método de detecção de *Campylobacter* nas fezes, apontando uma sensibilidade de apenas 60% quando comparada com os ensaios imunoenzimáticos e os métodos moleculares. Apontaram ainda, como no presente estudo, que uma maior detecção é obtida por teste imunoenzimático, seguido pelos testes moleculares (BESSÈDE *et al.*, 2011).

Possivelmente, a explicação para tão baixa sensibilidade do diagnóstico microbiológico se deve ao fato de que as espécies de *Campylobacter* são bactérias que apresentam requisitos especiais de cultivo, sendo o principal um ambiente pobre em oxigênio. Durante o processamento do material fecal, as bactérias podem ter contato prolongado com a atmosfera normal, e, como fator complicador, a usual utilização de kits comerciais para a

geração do ambiente propício ao crescimento das espécies microaerófilas gera uma diminuição progressiva na tensão de oxigênio (BESSÈDE *et al.*, 2011).

Além disso, os meios seletivos geralmente utilizados contêm antimicrobianos que podem inibir certas cepas de *Campylobacter* sp. Ocorrem ainda aspectos negligenciados como a exigência de hidrogênio gasoso na atmosfera cultivado, sem o qual muitas espécies não podem crescer, e, sobretudo porque o crescimento de *C. jejuni* e *C. coli* é facilitado por essa atmosfera contendo hidrogênio gasoso (ON, 2013). Ilustrando as condições sub-ótimas de cultivo, houve relatos de observação de bactérias espiraladas em esfregaços de material fecal, enquanto o crescimento de *Campylobacter* sp. em meio de cultura seletivo não ocorreu (BESSÈDE *et al.*, 2011).

O grupo francês sugere que, na falta de cultura positiva, seja considerada positiva a amostra que for positiva em ao menos um método molecular e, adicionalmente, um método imunoenzimático (BESSÈDE *et al.*, 2011).

Considerando essa determinação, como descrito acima para fins de cálculo do impacto das campilobacterioses nas internações em crianças brasileiras, o presente trabalho apresenta um percentual de 16,4% (37/226) amostras positivas que preenchem os critérios de Bessède e coautores, sendo, além das 20 amostras positivas por cultura, 12 amostras positivas simultaneamente por PCR, RT-PCR e ELISA, quatro positivas por PCR e ELISA e uma positiva por RT-PCR e ELISA (**Tabela 8**).

Inicialmente, a adoção dessa combinação de métodos ainda se destinaria apenas à pesquisa, visto que, as características técnicas e operacionais requeridas para a realização dos testes moleculares não se apresentam difundidas na vasta maioria dos serviços de saúde periféricos. A utilização desses métodos esbarra no preço dos equipamentos e dos consumíveis. Ainda, a estabilidade desses é altamente dependente de boas condições de armazenamento a frio, muitas vezes ausentes (ABUBAKAR *et al.*, 2007; BANO *et al.*, 2006).

Outros pontos cruciais seriam tanto o treinamento de pessoal quanto a intensa padronização inter-laboratórios que se fariam necessários. Tais necessidades demandariam esforços intensivos e combinados, além da definição de marcadores adicionais de infecção e/ou de fatores preditivos de cultura negativa, como foi demonstrado em um trabalho sobre a utilização de RT-PCR para a vigilância de casos de meningite bacteriana que vem ocorrendo em São Paulo (SACCHI *et al.*, 2011).

Os marcadores de inflamação intestinal ou de permeabilidade intestinal alterada, por exemplo, apresentam potencial como indicadores de infecção ou de impacto da infecção para



o desenvolvimento infantil (CHEN *et al.*, 2012; KOSEK *et al.*, 2013). Já a determinação da utilização prévia de antimicrobianos ou o tempo e as condições sofridas na fase pré-analítica pela amostra, desde a coleta até o cultivo, apresentam potencial como fatores preditivos de cultura negativa (JACKSON *et al.*, 2009; SACCHI *et al.*, 2011; WILSON; BADARUDEEN; GODWIN, 2011), o que potencialmente poderia explicar a baixa sensibilidade do teste hoje tido como padrão-ouro.

Ainda com relação ao uso de novas técnicas, mesmo o ensaio imunoenzimático é um teste relativamente caro para a rotina laboratorial e a escolha entre métodos imunoenzimáticos ou imunocromatográficos, que normalmente se equivalem, deve ser um ponto de futuras considerações para padronização e estudos sobre custo-efetividade (BESSÈDE *et al.*, 2011; DEDISTE *et al.*, 2003; KELLER; COHEN-BACRIE; PRÈRE, 2011).

O ensaio imunoenzimático utilizado no presente estudo (*ProSpect Campylobacter Microplate Assay*, REMEL, EUA), por exemplo, parece apresentar alta sensibilidade, uma vez que diagnosticou todos os casos positivos por coprocultura.

Estudo anterior que testou o mesmo teste da companhia REMEL em 1.250 amostras fecais, com coprocultura sendo realizada simultaneamente, determinou que tal ensaio apresentou 89% de sensibilidade e 97% de especificidade para *C. jejuni/C. coli* (DEDISTE *et al.*, 2003).

Ainda que tal grupo tenha determinado tão alta especificidade, foi relatado no mesmo trabalho que 2,3% (25/1.104) das amostras com coprocultura negativa foram positivas na ELISA (DEDISTE *et al.*, 2003). Esse dado é interessante, pois o grupo de Dediste estudou amostras de pacientes da Bélgica, local onde dificilmente se encontraria ou um perfil endêmico de infecções por *Campylobacter* sp. ou ainda infecções assintomáticas, como descrito para os países em desenvolvimento (COKER *et al.*, 2002; FERNÁNDEZ *et al.* 2008; FERNÁNDEZ, 2011; PAZZAGLIA *et al.*, 1991).

Dediste *et al.* descreveram que o teste ELISA *ProSpect* foi positivo para infecções por *C. upsaliensis* (nas quais a possibilidade de co-infecção por *C. jejuni* ou *C. coli* foi descartada) em proporção significativa dos casos (40%). Couturier *et al.* também reportaram a detecção de antígenos de *Campylobacter* sp. em amostras negativas pelo cultivo microbiológico, mas positivas pelo PCR para *C. upsaliensis* (2013). Em comparação com a prevalência de *C. jejuni*, a ocorrência de *C. upsaliensis* como agente etiológico de diarreia infantil é rara, embora existente em crianças bastante jovens (média de idade: 15 meses), como descrito por Jimenez *et al.* (1999).

Até o momento não existem dados sobre a ocorrência de infecções por *C. upsaliensis* no Brasil, embora Kuana *et al.* (2008) tenham demonstrado a circulação dessa espécie em carcaças de frango coletadas de granjas e matadouros de aves no Rio Grande do Sul. Fora do Brasil, a análise parcial dos dados da Tanzânia sobre o estudo multicêntrico Mal-ED demonstrou que, dentre as amostras com ELISA positiva para *Campylobacter* sp., cerca de 67% dessas, pela caracterização molecular eram *C. jejuni/C. coli* e 33% das mesmas foram caracterizadas como *Campylobacter* sp. não-*C.jejuni/C.coli*, sendo *C. hyointestinalis* a espécie mais encontrada (comunicação pessoal, Dr. Platts-Mills, 2013). Tais informações apontam para a necessidade de se pesquisar espécies de *Campylobacter* sp. não-*C.jejuni/C.coli* também na população infantil de Fortaleza, Ceará.

Sobre os dados obtidos com os testes moleculares, podemos inferir porque a detecção dos métodos moleculares utilizados não foi, no presente trabalho, 100% coincidentes entre si: ao analisarmos a especificidade dos iniciadores utilizados na RT-PCR, vemos que tal reação foi realizada com iniciadores capazes de detectar não somente várias cepas de *C. jejuni* (homologia entre 95-100%), mas também *C. coli* (homologia de 85%), *C. lari*, *C. hominis* e *C. fetus* (homologia entre 76-82%) (**Quadro 3**).

Os avanços laboratoriais decorrentes do uso de métodos moleculares são inquestionáveis na gestão e monitoramento de doenças infecciosas. Tais métodos podem ser utilizados para a tomada de decisões clínicas com base em quando e como tratar um paciente, bem como monitorar a eficácia de um regime terapêutico e identificar as potenciais cepas resistentes a drogas, o que pode gerar impacto sobre o manejo do paciente a longo prazo. Assim, é esperado que os laboratórios adotem medidas de controle de qualidade para garantir que os requisitos regulamentares necessários, tanto em nível nacional como internacional, sejam cumpridos. Em essência, os laboratórios devem garantir a adequação dos seus serviços através de um sistema de gestão de qualidade que monitora todos os aspectos do serviço de laboratório nas fases pré e pós-analítica. No entanto, a padronização de iniciadores, reagentes e condições de amplificação é ainda uma necessidade e não uma realidade (KRISHNA; CUNNION, 2012; WALLACE; MACKAY, 2013).

Quanto aos ensaios moleculares, qualquer amostra com o DNA específico de interesse abaixo do limite de detecção irá produzir resultados falso-negativos. Já os resultados falso-positivos ocorrerão se os genes, principalmente genes de virulência quando encontrados em elementos móveis como plasmídeos, existirem em diferentes espécies, além do agente patogênico alvo (LINDSAY *et al.*, 2013).

Em um trabalho recente sobre a concordância entre métodos moleculares e cultivo microbiológico a partir do estudo GEMS, foi relatado que a concordância foi consistentemente maior nos casos de diarreia do que dentre os controles saudáveis. O grupo apontou que essa observação pode ser atribuída à uma maior concentração do agente patogênico nos casos, sendo que quanto maior a concentração, mais provável a detecção do agente patogênico. Portanto, a quantificação do nível de micro-organismos nas fezes pode melhorar a capacidade para diagnosticar a causa exata da diarreia – abordagem particularmente importante para os países em desenvolvimento onde infecções múltiplas são comuns (LINDSAY *et al.*, 2013).

O grupo ainda apontou para a necessidade de melhorias nos testes moleculares, em termos de genes-alvo e capacidade de quantificação para o incremento da utilidade de tais métodos para o diagnóstico das doenças diarreicas nos países em desenvolvimento (LINDSAY *et al.*, 2013).

Uma extensa validação de novos diagnósticos para as doenças infecciosas é necessária, embora tal iniciativa ainda encontre como principais obstáculos os custos e a dificuldade de acesso a tais metodologias pelos países em desenvolvimento – os que mais se beneficiariam de tais ferramentas (ABUBAKAR *et al.*, 2007; HOORFAR, 2011). No caso específico das campilobacterioses, sem isolamento, identificação e subtipagem eficazes, tanto o diagnóstico como as intervenções apropriadas não podem ser efetivos, deixando vários estudos de cunho epidemiológico lutando para encontrar validade e legitimidade (ON, 2013).

No presente estudo, os resultados dos testes moleculares também não foram 100% coincidentes com o ensaio imunoenzimático, pois o mesmo, embora seja descrito como específico para antígenos de superfície de *C. jejuni/C. coli*, é capaz de detectar de forma não específica outras espécies de *Campylobacter* sp. (COUTURIER *et al.*, 2013; DEDISTE *et al.*, 2003).

No presente trabalho ocorreram limitações importantes em relação ao teste imunoenzimático, pois o mesmo não pôde ser realizado em todas as amostras do estudo por escassez de material biológico – o que impossibilitou uma avaliação mais completa. Também não avaliamos de forma específica a ocorrência de outras espécies que não *C. jejuni/C. coli*. Ainda assim, a importância do teste imunoenzimático como técnica de rastreamento (*screening*) foi validada por nossos dados, visto que foi o teste de maior sensibilidade (**Tabela 11**). A recomendação seria, portanto, realizar os métodos moleculares para determinação da espécie envolvida apenas nas amostras positivas por pelo teste de rastreamento (ELISA), o que vem sendo adotado no estudo coorte Mal-ED.

Será de grande utilidade ainda a pesquisa molecular de outras espécies de *Campylobacter* sp., como *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. pyloridis*, *C. upsaliensis* e *C. ureolyticus*, revisadas recentemente como também associadas aos casos de enterite humana (ON, 2013). Tal pesquisa, para uma abordagem clínica ou epidemiológica, necessita de vigilância e supervisão constantes, além de um estudo aprofundado sobre o estado atual da classificação taxonômica das espécies, visto que recentemente foi demonstrado que um ensaio originalmente concebido apenas para a detecção de *C. jejuni* e *C. coli* apresentava a capacidade de detectar adicionalmente as espécies *C. lari* subsp. *concheus* e *C. volucris* (ON, 2013).

O recente trabalho do grupo de On *et al.* (2013) sugere a adoção de um algoritmo para revalidação e certificação dos protocolos de pesquisa molecular existentes, visto que a taxonomia de *Campylobacter* e micro-organismos relacionados (ou seja, a classe Epsilonproteobacteria) tem evoluído a cada ano desde 1988 e contém atualmente mais de 100 táxons, o que demonstra que a identificação precisa das cepas é especialmente desafiadora. Ainda, publicações especializadas como o *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, nas quais centenas de novas espécies são descritas a cada ano, demonstram que tal dinâmica não é exclusiva do gênero *Campylobacter*, ocorrendo o mesmo com outros patógenos relacionados à contaminação alimentar.

Resumidamente, as recomendações do grupo, para a harmonização e padronização dos métodos de detecção de patógenos relacionados à contaminação alimentar, como *Campylobacter* sp., incluem: (i) verificar periodicamente (pelo menos anualmente) as alterações taxonômicas internacionalmente aceitas referentes ao gênero estudado (utilizando ferramentas como *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*) (LPSN, 2013); (ii) Avaliar as relações filogenéticas de qualquer novo taxon de relevância para o laboratório participante, e (iii) obter DNA purificado ao menos das cepas com maior parentesco filogenético para testes de especificidade, a partir de coleções respeitáveis (ATCC e NCTC, por exemplo). (ON *et al.*, 2013). Estudos futuros para a detecção de outras espécies de *Campylobacter* sp., portanto, permitirão a melhora das técnicas utilizadas assim como a avaliação da importância de outras cepas não-*C. jejuni/C. coli* para a saúde infantil.

Os protocolos de RT-PCR, em geral, apresentam grandes vantagens quando comparados com a PCR comum, em termos de velocidade e sensibilidade, redução de riscos de contaminação nas etapas de detecção e possibilidade de quantificação do patógeno em unidades formadoras de colônia (CFU) por quantidade de amostra (AMAR *et al.*, 2007; BARLETTA *et al.*, 2011; KUBISTA *et al.*, 2006; PLATTS-MILLS; LIU; HOUP, 2013), e

devem ser priorizados em estudos vindouros, visto que o IBISAB/UFC possui a capacidade técnica e material para a execução de tais procedimentos (LIMA *et al.*, 2013b).

Investigações futuras devem ser realizadas a fim de se determinar a importância das espécies não-*C.jejuni/C.coli* na população infantil de Fortaleza, além da determinação da quantidade de CFU/amostra em diferentes momentos da doença clínica no intuito de avaliar se a carga bacteriana presente nas amostras estaria relacionada à capacidade do exame microbiológico em diagnosticar a infecção (ON, 2013), ou ainda se estaria relacionada aos parâmetros clínicos apresentados e/ou surgimento de agravos, como o déficit no desenvolvimento físico (LEE *et al.*, 2013). Ainda, desenhos mais complexos de estudos se fazem necessários para a padronização, escolha e adoção de métodos mais sensíveis para o diagnóstico das infecções por *Campylobacter* sp. (BANOO *et al.*, 2006; LINDSAY *et al.*, 2013; ON, 2013; ON *et al.*, 2013).

## 7 CONCLUSÃO

Nos países em desenvolvimento, onde a motivação e capacidade dos laboratórios para vigilância epidemiológica em doenças diarreicas é pequena, estudos transversais sobre a prevalência de enteropatógenos constituem ferramentas importantes para a avaliação de agentes etiológicos envolvidos.

Por uma combinação de métodos diagnósticos (microbiológico, molecular e imunoenzimático) foi demonstrado que *Campylobacter* sp. estava presente em 16,4% das amostras diarreicas estudadas, sendo que as crianças afetadas na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, apresentaram, principalmente, dor abdominal, febre e vômitos.

O perfil de distribuição dos genes de virulência de *C. jejuni* não apresentou correlação com a apresentação clínica da doença, mesmo quando tal perfil foi categorizado de acordo com a função das proteínas codificadas pelos genes (colonização, invasão ou produção de toxina), o que nos leva a crer que outros fatores relacionados ao hospedeiro sejam mais importantes na definição do quadro clínico.

Corroboramos recentes dados internacionais sobre a necessidade de redirecionamento das diretrizes para o diagnóstico de *Campylobacter* sp. na infância, à luz das limitações do diagnóstico microbiológico e das altas sensibilidade e especificidade dos testes moleculares e imunoenzimáticos.

Estudos futuros serão necessários para a determinação de fatores de susceptibilidade do hospedeiro, a quantificação dos micro-organismos excretados em diferentes momentos da doença clínica, marcadores de inflamação intestinal, identificação de fatores preditivos de cultura negativa, além da pesquisa de outras espécies de *Campylobacter* sp., não *C. jejuni/coli* e seu possível impacto na população infantil.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, K.; EMIG, M.; BERNSTEIN, J.M. Sepsis and pericarditis caused by *Campylobacter fetus*: case report and literature review. **J. Ark. Med. Soc.**, v. 108, n. 5, p. 88-89, 2011.
- ABUBAKAR, I.; IRVINE, L.; ALDUS, C.F.; WYATT, G.M.; FORDHAM, R.; SCHELENZ, S.; *et al.* A systematic review of clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. **Health Technol. Assess.**, v. 11, n. 36, p. 1-216, 2007.
- AGOSTINI, C.; BASELLI, L.; MAZZONI, M.B. Early nutrition patterns and diseases of adulthood: a plausible link? **Eur. J. Intern. Med.**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 2013.
- AHMED, I.S.; ELTOM, A.R.; KARRAR, Z.A.; GIBRIL, A.R. Knowledge, attitudes, and practices of mothers regarding diarrhea among children in a Sudanese community. **East. Afr. Med. J.**, v. 71, n. 11, p. 716-719, 1994.
- AILES, E.; SCALLAN, E.; BEKELMAN, R.L.; KLEINBAUM, D.G.; TAUXE, R.V.; MOE, C.L. Do differences in risk factors, medical care seeking, or medical practices explain the geographic variation on campylobacteriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites? **Clin. Infect. Dis.**, v. Suppl. 5; p. S464-S471, 2012.
- AJJAMPUR, S.S.; RAJENDRAN, P.; RAMANI, S.; BANERJEE, I.; MONICA, B.; SANKARAN, P. *et al.* Closing the diarrhoea diagnostic gap in Indian children by the application of molecular techniques. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, pt. 11, p.1364-1368, 2008. doi:10.1099/jmm.0.2008/003319-0
- AL JAROUSHA, A.M.; EL JAROU, M.A.; EL QOUQA, I.A. Bacterial enteropathogens and risk factors associated with childhood diarrhea. **Indian J. Pediatr.**, v. 78, n. 2, p. 165-170, 2011.
- AL-MAHMEED, A.; SENOK, A. C.; ISMAEEL, A. Y.; BINDAYNA, K. M.; TABBARA, K. S.; BOTTA, G. A. Clinical relevance of virulence genes in *Campylobacter jejuni* isolated in Bahrain. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 839-843, 2006.
- ALLOS, B.M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, n. 8, p. 1201-1206, 2001.
- AMAR, C.F.; EAST, C.L.; GRAY, J.; ITURRIZA-GOMARA, M.; MACLURE, E.A.; MCLAUCHLIN, J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English casecontrol Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, p. 311-323, 2007.
- ANDRADE, J.A.B.; FAGUNDES-NETO, U. Diarreia persistente: ainda um importante desafio para o pediatra. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 87, n. 3, p. 199-205, 2011.
- ANDRZEJEWSKA, M.; KLAWE, J.J.; SZCZEPANSKA, B.; SPICA, D. Occurrence of virulence genes among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from domestic animals and children. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 14, p. 207-211, 2011.

- ANG, C.W.; LAMAN, J.D.; WILLISON, H.J.; WAGNER, E.R.; ENDTZ, H.P.; DE KLERK, M.A.; *et al.* Structure of *Campylobacter jejuni* lipolysaccharides determines antiganglioside specificity and clinical features of Guillain-Barré and Miller Fisher patients. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 3, p. 1202-1208, 2002.
- ARIGANELLO, P.; ANGELINO, G.; SCARSELLI, A.; SALFA, I.; DELLA CORTE, M.; DE MATTEIS, A. *et al.* Relapsing *Campylobacter jejuni* systemic infections in a child with X-linked agammaglobulinemia. **Case Rep. Pediatr.**, 735108, 2013.
- ASSOCIAÇÃO COMERCIAL DE SÃO PAULO. **Média mensal da cotação do dólar comercial para venda em real**, 2012. Disponível em: <[http://www.acsp.com.br/indicadores/IEGV/IEGV\\_DOLAR.HTM](http://www.acsp.com.br/indicadores/IEGV/IEGV_DOLAR.HTM)> Acesso em 09 Set. 2012.
- AULD, H.; MACIVER, D.; KLAASSEN, J. Heavy rainfall and waterborne disease outbreaks: the Walkerton example. **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v. 67, n. 20-22, p. 1879-1887, 2004.
- BACHTIAR, B.M.; COLOE, P.J.; FRY, B.N. Knock out mutagenesis of the *kpsE* gene of *Campylobacter jejuni* 81116 and its involvement in bacterium-host interactions. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 149-154, 2007.
- BACKERT, S.; HOFREUTER, D. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **J. Microbiol. Methods**, v. 95, n. 1, p. 8-23, 2013.
- BACON, D. J.; ALM, R. A.; BURR, D. H.; HU, L.; KOPECKO, D. J.; EWING, C. P.; TRUST, T. J.; GUERRY, P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 4384-4390, 2000.
- BACON, D.J.; SZYMANSKI, C.M.; BURR, D.B.; SILVER, R.P.; ALM, R.A.; GUERRY, P. A phase variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 769-777, 2001.
- BACON, D. J.; ALM, R. A.; HU, L.; EWING, C.P.; BATCHELOR, R.A.; TRUST, T. J.; GUERRY, P. DNA sequence and mutational analysis of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6242-6250, 2002.
- BAE, J.; JEON, B. Increased emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in biofilm. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 10, p. 5195-5196, 2013.
- BAKER, M.G.; KVALSVIG, A.; ZHANG, J.; LAKE, R.; SEARS, A.; WILSON, N. Declining Guillain-Barré syndrome after campylobacteriosis control, New Zealand, 1988-2010. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, n. 2, p. 226-233, 2012.
- BANOO, S.; BELL, D.; BOSSUYT, P.; HARRING, A.; MABEY, D.; POOLE, F. *et al.* Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, Suppl. 12, p. S20-S32, 2006.



BARLETTA, F.; OCHOA, T.J.; MERCADO, E.; RUIZ, J.; ECKER, L.; LOPEZ, G. *et al.* Quantitative real-time polymerase chain reaction for enteropathogenic *Escherichia coli*: a tool for investigation of asymptomatic versus symptomatic infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 53, p.1223-1229, 2011.

BEAUREPAIRE, C.; SMYTH, D.; MCKAY, D.M. Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability. **J. Interferon Cytokin. Res.**, v. 29, n. 3, p. 133-144, 2009.

BELANGER, A.E.; SHRYOCK, T.R. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 60, n. 4, p. 715-723, 2007.

BELLIDO-BLASCO, J.B.; GONZÁLEZ-CANO, J.M.; GALIANO-ARLANDIS, J.V.; HERRERO-CAROT, C.; TIRADO-BALAQUER, M.D.; ARNEDO-PENA, A. *et al.* Risk factors for the occurrence of sporadic *Campylobacter*, Salmonella and rotavirus diarrhea in preschool children. **An. Pediatr. (Barc)**, v. 66, n. 4, p. 367-374, 2007.

BELTINGER, J.; DEL BUONO, J.; SKELLY, M.M.; THORNLEY, J.; SPILLER, R.C.; STACK, W.A.; HAWKEY, C.J. Disruption of colonic barrier function and induction of mediator release by strains of *Campylobacter jejuni* that invade epithelial cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 48, p. 7345-7652, 2008.

BESSÈDE, E.; DELCAMP, A.; SIFRÉ, E.; BUISSONNIÈRE, A.; MÉGRAUD, F. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 941-944, 2011. doi: 10.1128/JCM.01489-10.

BISWAS, D.; FERNANDO, U.M.; REIMAN, C.D.; WILLSON, P.J.; TOWNSEND, H.G.; POTTER, A.A.; ALLAN, B.J. Correlation between in vitro secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. **Curr. Microbiol.**, v. 54, n. 3, p. 207-212, 2007.

BLACK, R.E.; LEVINE, M.M.; CLEMENTS, M.L.; HUGHES, T.P.; BLASER, M.J. Experimental *Campylobacter jejuni* infections in humans. **J. Infect. Dis.**, v. 157, n. 3, p. 472-479, 1988.

BLASER, M.J. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. S103-S105, 1997.

BMJ EVIDENCE CENTER. *Campylobacter*. Tratamento. **British Medical Journal – Best Practice**, 2012. Disponível em: < <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/1175/treatment/step-by-step.html> >. Acesso em: 07 Aug. 2013.

BOCCOLINI, C.S.; BOCCOLINI, P.M.M. Relationship between breastfeeding and hospitalization due to diarrheal diseases among children under one year of life in Brazilian state capitals and the federal district, 2008. **Epidemiol. Serv. Saúde.**, v. 20, n. 1, p. 19-26, 2011.

BOLAN, R.S.; DAL BÓ, K.; VARGAS, F.R.; MORETTI, G.R.F.; ALMEIDA, L.P.; ALMEIDA, G.K.P.; DIAS, P.V.L. Síndrome de Guillain-Barré. **Rev. AMRIGS. (Porto Alegre)**, v. 51, n. 1, p. 58-61, 2007.

BRANDAL, L.T.; LINDSTEDT, B.A.; AAS, L.; STAVNES, T.L.; LASSEN, J.; KAPPERUD, G. Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **J. Microbiol. Meth.**, v. 68, p. 331-341, 2007. doi: 10.1016/j.mimet.2006.09.013.

BRÁS, A. M.; CHATTERJEE, S.; WREN, B. W.; NEWELL, D. G.; KETLEY, J. M. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3298–3302, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa de prevalência de aleitamento materno em municípios brasileiros**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/redeblh/media/pamuni.pdf>>. Acesso em: 12 Dez. 2012.

BUZBY, J.C.; ALLOS, B.M.; ROBERTS, T. The economic burden of Campylobacter-associated Guillain-Barré syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 176, Suppl. 2, p. S192-S197, 1997.

BUZBY, J.C.; ROBERTS T. Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. **World Health Stat. Q.**, v. 50, p. 5–66, 1997.

BUZBY, J.C.; ROBERTS T. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. **Gastroenterol.**, v. 136, p. 1851-1862, 2009.

BYRD, J.A.; SAMS, A.R.; HARGIS, B.M.; CALDWELL, D.J. Effect of selected modified atmosphere packaging on *Campylobacter* survival in raw poultry. **Poult. Sci.**, v. 90, n. 6, p. 1324-1328, 2011.

CALVA J.J.; RUIZ-PALACIOS, G.M.; LOPEZ-VIDAL, A.B.; RAMOS, A.; BOJALIL, R. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. **Lancet**, v. 1, n. 8584, p. 503-506, 1988.

CAMPOS. M.A.; VARGAS, M.A; REGUEIRO, V.; LLOMPARTI, C.M.; ALBERTÍ, S.; BENGOCHEA, J.A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, 2004.

CAMPYLOBACTER MLST, 2013. Disponível em: <<http://pubmlst.org/campylobacter/>>. Acesso em: 20 Jan. 2013.

CAPPELLIER, J.M.; LAZARO, B.; ROSSERO, A.; FERNANDEZ-ASTORGA, A.; FEDERIGHI, M. Double staining (CTC-DAPI) for detection and enumeration of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells. **Vet. Res.**, v.28, n. 6, p. 547-555, 1997.

CARAMELLI, B.; MANSUR, A.J.; GRINBERG, M.; MENDES, C.M.; PILEGGI, F. *Campylobacter fetus* endocarditis on a prosthetic heart valve. **South Med. J.**, v. 81, n. 6, p. 802-803, 1988.

CARPORALE, C.M.; PAPOLA, F.; FIORONI, M.A.; AURELI, A.; GIOVANNINI, A.; NOTTURNO, F.; *et al.* Susceptibility to Guillain-Barré syndrome is associated to polymorphisms of CD1 genes. **J. Neuroimmunol.**, v. 177, n. 1-2, p. 112-118, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Etymologia:** *Campylobacter*. 2013a. Disponível em: < [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/8/ET-1908\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/8/ET-1908_article.htm) >. Acesso em: 2 Aug. 2013.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food:** Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2012. 2013b. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6215a2.htm> >. Acesso em: 29 July 2013.

CHAMBERS, H.F. Protein Synthesis Inhibitors and Miscellaneous Antibacterial Agents. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. New York, USA: McGraw-Hill Medicine, 2005. Cap. 46.

CHAMPION, O.L.; GAUNT, M.W.; GUNDOGDU, O.; ELMI, A.; WITNEY, A.A., HINDS, J.; DORRELL, N.; WREN, B.W. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 102, n. 44, p. 16043-16048, 2005.

CHAMPION, O.L.; KARLYSHEV, A.V.; SENIOR, N.J.; WOODWARD, M.; LA REGIONE, R.; HOWARD, S.L. *et al.* Insect infection model for *Campylobacter jejuni* reveals that O-methyl phosphoramidate has insecticidal activity. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 5, p. 776-782, 2010.

CHEN, C.C.; HAUNG, J.L.; CHANG, C.J.; KONG, M.S. Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 55, n. 5, p. 541-547, 2012.

CHEN, M.L.; GE, Z.; FOX, J.G.; SCHAUER, D.B. Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 12, p. 6581-6589, 2006.

CHEVALIER, P.; DELPEUCH, F.; MAIRE, B. The “malnutrition-infection” complex, the most widespread public health problem in underprivileged populations. **Med. Mal. Infect.**, v. 26, p. 366-370, 1996.

CHIONH, Y.T.; WEE, J.L.; EVERY, A.L.; NG, G.Z.; SUTTON, P. M-cell targeting of the whole killed bacteria induces protective immunity against gastrointestinal pathogens. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 7, p. 2962-2970, 2009.

COKER, A.O.; ISOKPEHI, R.D.; THOMAS, B.N.; AMISU, K.O.; OBI, C.L. Human campylobacteriosis in developing countries. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 3, p. 237-244, 2002.

COLLES, F.M.; MAIDEN, M.C. *Campylobacter* sequence typing databases: applications and future prospects. **Microbiology**, v. 158, p. 2695-2709, 2012.

CORCIONIVOSCHI, N.; CLYNE, M.; LYONS, A.; ELMI, A.; GUNDOGDU, O.; WREN, B.W.; *et al.* *Campylobacter jejuni* co-cultured with epithelial cells reduces surface capsular polysaccharide expression. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1959-1967, 2009.

COUTURIER, B.A.; COUTURIER, M.R.; KALP, K.J.; FISHER, M.A. Detection of non-*jejuni* and *-coli* *Campylobacter* species from stool specimens with and immunochromatographic antigen detection assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 1935-1937, 2013.

DABOUSSI, F.; ALAM, S.; MALLAT, H.; HLAIS, S.; HAMZE, M. Preliminary study on the prevalence of *Campylobacter* in childhood diarrhea in north Lebanon. **East. Mediterr. Health J.**, v. 18, n. 12, p. 1225-1228, 2012.

DASTI, J.I., TAREEN, M., LUGERT, R., FAUTNER, A.E., GROB, U. *Campylobacter jejuni*: A brief review on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 205-211, 2010.

DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 345-348, 2003.

DEDISTE, A.; VANDENBERG, O.; VLAES, L.; EBRAERT, A.; DOUAT, N.; BAHWERE, P. et al. Evaluation of the *ProSpect Microplate Assay* for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, n. 11, p. 11085-1090, 2003.

DELGADO, H.L.; VALVERDE, V.; BELIZAN, J.M.; KLEIN, R.E. Diarrheal diseases, nutritional status and health care: analysis of their interrelationships. **Ecol. Food Nutr.**, v. 12, p. 229-234, 1983. doi: 10.1080/03670244.1983.9990720.

DATASUS. **Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde**. 2012a. Disponível em: <<http://cnes.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 25 out. 2012.

DATASUS. **Informações de Saúde; Morbidade hospitalar do SUS por local de internação; Valores de serviços hospitalares segundo Região**. 2012b. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 15 Ago. 2012.

DATASUS. **Morbidade Hospitalar do SUS – por local de internação - Ceará**. 2013. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niCE.def>>. Acesso em: 14 Jan. 2013.

DIAS, T.C.; QUEIROZ, D.M.; MENDES, E.N.; PERES, J.N. Chicken carcasses as a source of *Campylobacter jejuni* in Belo Horizonte, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 32, n. 6, p. 414-418, 1990.

DIAS-TOSTA, E.; KÜCKELHAUS, C.S. Guillain Barré syndrome in a population less than 15 years old in Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, n. 2-B, p. 367-373, 2002.

DISANTIS, K.I.; COLLINS, B.N.; FISHER, J.O.; DAVEY, A. Do infants fed directly from the breast have improved appetite regulation and slower growth during early childhood compared with infants fed from a bottle? **Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.**, v. 8, n. 89, p. 1-11, 2011. doi: 10.1186/1479-5868-8-89.

DORREL, N.; MANGAN, J.A.; LAING, K.G.; HINDS, J.; LINTON, D.; AL-GHUSEIN, H.; *et al.* Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. **Genome Res.**, v. 11, n. 10, p. 1706-1715, 2001.

DORRELL, N.; WREN, B.W. The second century of Campylobacter research: recent advances, new opportunities and old problems. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 5, p. 514-518, 2007.

DOURADO, M.E.; FÉLIX, R.H.; SILVA, W.K.; QUEIROS, J.W.; JERONIMO, S.M. Clinical characteristics of Guillain-Barré syndrome in a tropical country: a Brazilian experience. **Acta Neurol. Scand.**, v. 125, n. 1, p. 47-53, 2012.

DUNLOP, S.P.; JENKINS, D.; NEAL, K.R.; SPILLER, R.C. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. **Gastroenterol.**, v. 125, p. 1651-1659, 2003.

DUPONT, H. L. What's new in enteric infectious diseases at home and abroad. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, n. 5, p. 407-412, 2005.

EDWARDS, L.A.; NISTALA, K.; MILLS, D.C.; STEPHENSON, H.N.; ZILBAUER, M.; WREN, B.W. *et al.* Delineation of the innate and adaptive T-cell immune outcome in the human host in response to *Campylobacter jejuni* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 11, e15398, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0015398

EIDELMAN, A.I. Amamentação e desenvolvimento cognitivo: existe uma associação? **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 89, p. 327-329, 2013.

ELSHAFIE, S.S.; ASIM, M.; ASHOUR, A.; ELHIDAY, A.H.; MOHSEN, T.; DOIPHODE, S. *Campylobacter* peritonitis complicating continuous ambulatory peritoneal dialysis: report of three cases and review of the literature. **Perit. Dial. Int.**, v. 30, n. 1, p. 99-104, 2010.

ESMERALDA, V.; MEDINA ANGULO, L.A. Enteropathogens responsible for gastrointestinal disorders in HIV patients. **Invest. Clin.**, v. 54, n. 1, p. 90-108, 2013.

ESTEVEZ, W.T.C.; FERREIRA, A.P.; SICILIANO, S. Potencial impacto na saúde pública por *Campylobacter* spp. Estudo de caso: curso inferior do Rio São João, RJ, Brasil. **Cad. Saúde Colet.**, v. 19, n. 1, p. 74-81, 2011.

EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **Euro Surveill.**, v. 17, n.10, p. 20113, 2012.

FEODOROFF, B.; ELLSTRÖM, P.; HYYTIÄINEN, H.; SARNA, S.; HÄNNINEN, M.L.; RAUTELIN, H. *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. **Gut Pathog.**, v. 2, n. 1, p. 22, 2010.

FERNÁNDEZ, H.; VERA, F.; VILLANUEVA, M. P.; GARCÍA, A. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 56-58, 2008.

FERNÁNDEZ, H. Família Campylobacteraceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 357-362.

FERNÁNDEZ, H. *Campylobacter* e Campylobacteriosis: una Mirada desde América del Sur. **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica**, v. 28, n.1, p. 121-127, 2011.

FERNÁNDEZ-CRUZ, A.; MUÑOZ, P.; MOHEDANO, R.; VALERIO, M.; MARÍN, M.; ALCALÁ, L.; *et al.* *Campylobacter* bacteremia: clinical characteristics, incidence, and outcome over 23 years. **Medicine (Baltimore)**, v. 89, n. 5, p. 319-330, 2010.

FERRARINI, M.A.G.; SCATTOLIN, M.A.A.; RODRIGUES, M.M.; RESENDE, M.H.F.; SANTOS, I.C.L.; IAZZETTI, A.V. Síndrome de Guillain-Barré em associação temporal com a vacina influenza A. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 29, n. 4, p. 685-688, 2011.

FICA, A.; SEELMANN, D.; PORTE, L.; EUGENIN, D.; GALLARDO, R. A case of myopericarditis associated to *Campylobacter jejuni* infection in the southern hemisphere. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 16, n. 3, p. 294-296, 2012.

FIOCRUZ. Comissão Nacional sobre Determinantes Sociais da Saúde. **As causas sociais sobre as iniquidades em saúde no Brasil**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <<http://www.cndss.fiocruz.br/pdf/home/relatorio.pdf>>. Acesso em: 30 Abr. 2012.

FOUTS, D.E.; MONGODIN, E.F.; MANDRELL, R.E.; MILLER, W.G.; RASKO, D.A.; RAVEL, J.; *et al.* Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 1, p. 72-85 (e15), 2005. doi: 10.1371/journal.pbio.0030015

FRANÇA, E.; MOREIRA DE SOUZA, J.; CROSLAND GUIMARÃES, M.D.; GOULART, E.M.; COLOSIMO, E.; FIGUEIREDO ANTUNES, C.M. Association between socioeconomic factors and infant deaths due to diarrhea, pneumonia, and malnutrition in a metropolitan area of Southeast Brazil: a case-control study. **Cad. Saude Publica**, v. 17, n. 6, p. 1437-1447, 2001.

FRIIS, L.M.; PIN, C.; TAYLOR, D.E.; PEARSON, B.M.; WELLS, J.M. A role for the tet(O) plasmid in maintaining *Campylobacter* plasticity. **Plasmid**, v. 57, n. 1, p. 18-28, 2007.

FRIIS, L.M.; KEELAN, M.; TAYLOR, D.E. *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 4, p. 1553-1560, 2009.

GALANIS, E. *Campylobacter* and bacterial gastroenteritis. **CMAJ**, v. 177, n. 6, p. 570-571, 2007.

GARCÍA RODRÍGUEZ, L.A.; RUIGÓMEZ, A.; PANÉS, J. Use of acid-suppressing drugs and the risk of bacterial gastroenteritis. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 5, n. 12, p. 1418-1423, 2007.

GARG, A.X.; POPE, J.E.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; CLARK, W.F.; OUIMET, J.; WALKERTON HEALTH STUDY INVESTIGATORS. Arthritis risk after acute bacterial gastroenteritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 47, n. 2, p. 200-204, 2008.

GAUTRET, P.; CRAMER, J.P.; FIELD, V.; CAUMES, E.; JENSENIUS, M.; GKCRANIA-KLOTSAS, E.; *et al.* Infectious diseases among travelers and migrants in Europe, EuroTravNet 2010. **Euro. Surveill.**, v. 17, n. 26, p. 20205, 2012.

GE, Z.; SCHAUER, D.B.; FOX, J.G. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. **Cell Microbiol.**, v. 10, n. 8, p. 665-679, 2007.

GLASEL, J.A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. **Biotechniques**, v. 18, n. 1, p. 62-3, 1995.

GLASS, R.I.; STOLL, B.J.; HUQ, M.I.; STRUELENS, M.J.; BLASER, M.; KIBRIYA, A.K. Epidemiologic and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. **J. Infect. Dis.**, v. 148, n. 2, p. 292-296, 1983.

GONZÁLEZ-ABAD, M.J.; ALONSO-SANZ, M. Incidence and susceptibility of *Campylobacter jejuni* in pediatric patients: involvement in bacteremia. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 26, n. 2, p. 92-96, 2013.

GONZÁLEZ-HEIN, G.; CORDERO, N.; GARCÍA, P.; FIGUEROA, G. Molecular analysis of fluoroquinolones and macrolides resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from humans, bovine and chicken meat. **Rev. Chilena Infectol.**, v. 30, n. 2, p. 135-139, 2013.

GOSH, R.; UPPAL, B.; AGGARWAL, P.; CHAKRAVARTI, A.; JHA, A.K. Increasing antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* in a tertiary care hospital in New Delhi, India. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 7, n. 2, p. 247-249, 2013.

GRADEL, K.O.; NIELSEN, H.L.; SCHØNHEYDER, H.C.; EJLERTSEN, T.; KRISTENSEN, B.; NIELSEN, H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after *Salmonella* or *Campylobacter* gastroenteritis. **Gastroenterol.**, v. 137, p. 495-501, 2009a.

GRADEL, K.O.; NORGAARD, M.; DETHLEFSEN, C.; SCHONHEYDER, H.C.; KRISTENSEN, B.; EJLERTSEN, T.; NIELSEN, H. Increased risk of zoonotic *Salmonella* and *Campylobacter* gastroenteritis in patients with haematological malignancies: a population-based study. **Ann. Hematol.**, v. 88, n. 8, p. 761-767, 2009b.

GRANT, K.A.; BELANDIA, I.U.; DEKKER, N.; RICHARDSON, P.T.; PARK, S.F. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 4, p. 1172-1180, 1997.

GRIFFITHS, S.L.; SALMON, R.L.; MASON, B.W.; ELLIOT, C.; THOMAS, D.R.; DAVIES, C. Using the internet for rapid investigation of an outbreak of diarrheal illness in mountain bikers. **Epidemiol. Infect.**, v. 138, n. 12, p. 1704-1711, 2010.

GUBBELS, S.M.; KUHN, K.G.; LARSSON, J.T.; ADELHARDT, M.; ENGBERG, J.; INGILDSSEN, P.; *et al.* A waterborne outbreak with a single clone of *Campylobacter jejuni* in the Danish town of Koge in May 2010. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 44, n. 8, p. 586-594, 2012.

GUERRANT, R.L.; HUGHES, J.M.; LIMA, N.L.; CRANE, J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, p. S41-50, 1990.

GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; McAULIFFE, J. F.; de SOUZA, M. A. Diarrhea as a cause and an effect of malnutrition: diarrhoea prevents catch up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, n. 1, pt. 2, p. 28-35, 1992.

GUERRANT, R.L.; VAN GILDRE, T.; STEINER, T.S.; THIELMAN, N.M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R.V.; *et al.* Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, n. 3, p. 331-351, 2001.

GUERRY, P.; POLY, F.; RIDDLE, M.; MAUE, A.C.; CHEN, Y.H.; MONTEIRO, M.A. *Campylobacter* polysaccharide capsules: virulence and vaccines. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 2, n. 7, p. 1-11, 2012. doi: 10.3389/fcimb.2012.00007.

GUPTA, S.S.; MOHAMMED, M.H.; GHOSH, T.S.; KANUNGO, S.; NAIR, S.; MANDE, S.S. Metagenome of the gut of a malnourished child. **Gut Pathog.**, v. 3, p. 7, 2011. doi: 10.1186/1757-4749-3-7.

HABIB, I.; LOUWEN, R.; UYTENDAELE, M.; HOUF, K.; VANDENBERG, O.; NIEUWENHUIS, E.E.; *et al.* Correlation between genotypic diversity, lipooligosaccharide gene locus class variation, and Caco-2 cell invasion of *Campylobacter jejuni* isolates from chicken meat and humans: contribution to virulotyping. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 13, p. 4277-4288, 2009.

HABIB, I.; BERKVEN, D.; DE ZUTTER, L.; DIERICK, K.; VAN HUFFEL, X.; SPEYBROECK, N.; *et al.* *Campylobacter* contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection. **Food Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2012.

HADDAD, N.; MARCE, C.; MAGRAS, C.; CAPPELIER, J.M. An overview of methods used to clarify pathogenesis mechanisms of *Campylobacter jejuni*. **J. Food Prot.**, v. 73, n. 4, p. 786-802, 2010.

HAMIDIAN, M.; SANAEI, M.; BOLFION, M.; DABIRI, H.; ZALI, M.R.; WALTHER-RASMUSSEN, J. Prevalence of putative virulence markers in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hospitalized children, raw chicken, and raw beef in Tehran, Iran. **Can. J. Microbiol.**, v.57, n. 2, p. 143-148, 2011.

HARUYAMA, A.; TOYODA, S.; KIKUCHI, M.; ARIKAWA, T.; INAMI, S.; OTANI, N.; *et al.* *Campylobacter fetus* as cause of prosthetic valve endocarditis. **Tex. Heart Inst. J.**, v. 38, n. 5, p. 584-587, 2011.



HAUGHTON, P.N.; LYNG, J.; CRONIN, D.; FANNING, S.; WHYTE, P. Effect of crust freezing applied alone and in combination with ultraviolet light on the survival of *Campylobacter* on raw chicken. **Food Microbiol.**, v. 32, n. 1, p. 147-151, 2012.

HAVELAAR, A.H.; DE WIT, M.A.; VAN KONINGSVELD, R.; VAN KEMPEN, E. Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter* spp. **Epidemiol. Infect.**, v. 125, n. 3, p. 505-522, 2000.

HAVELAAR, A.H.; VAN PELT, W.; ANG, C.W.; WAGENAAR, J.A.; VAN PUTEN, J.P.M.; GROSS, U.; NEWELL, D.G. Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 35, n. 1, p. 1-22, 2009.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MOLBAK, K. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, n. 4, p. 498-506, 2006.

HERMANS, D.; PASMANS, F.; MESSENS, W.; MARTEL, A.; VAN IMMERSEEL, F.; HEYDRICKX, M. *et al.* Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 12, n. 2, p. 89-98, 2012.

HEUVELINK, A.E.; VAN HEERWAARDEN, C.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, A.; TILBURG, J.J.; BOS, M.H.; HEILMANN, F.G.; *et al.* Two outbreaks of campylobacteriosis associated with consumption of raw cows' milk. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 134, n. 1-2, p. 7074, 2009.

HOFREUTER, D.; TSAI, J.; WATSON, R.O.; NOVIK, V.; ALTMAN, B.; BENITEZ, M. *et al.* Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 8, p. 4694-4707, 2006.

HOFREUTER, D.; NOVIK, V.; GÁLAN, J.E. Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. **Cell Host Microbe.**, v. 4, n. 5, p. 425-433, 2008.

HOORFAR, J. Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. **APMIS**, v. 133, Suppl., p. 1-24, 2011.

HOPKINS, R.S.; OLMSTED, R.; ISTRE, G.R. Endemic *Campylobacter jejuni* infection in Colorado: identified risk factors. **Am. J. Public Health**, v. 74, n. 3, p. 249-250, 1984.

HORROCKS, S.M.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J.; RICKE, S.C. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 18-25, 2009.

HURD, S.; PATRICK, M.; HATCH, J.; CLOGHER, P.; WYMORE, K.; CRONQUISTA, A.B. *et al.* Clinical laboratory practices for the isolation and identification of *Campylobacter* in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites: baseline information for understanding changes in surveillance data. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, Suppl. 5, p. S440-S445, 2012.

INGLIS, G.D.; BORAS, V.F.; HOUDE, A. Enteric campylobacteria and RNA viruses associated with healthy and diarrheic humans in the Chinook health region of Southwestern Alberta, Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v.49, p. 209-219, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo 2010**. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/link.php?uf=ce>>. Acesso em: 13 Maio 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores IBGE, Estatística da Produção Pecuária**. 2012. Disponível em:< [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos\\_201201\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abat-e-leite-couro-ovos_201201_publ_completa.pdf)>. Acesso em: 29 Ago. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo 2010, Características urbanísticas do entorno dos domicílios**. 2013. Disponível em:< <http://www.censo2010.ibge.gov.br/entorno/>>. Acesso em: 11 Jan. 2013.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ (IPECE). **Informe 44: Perfil Municipal de Fortaleza. Tema IX: As condições domiciliares dos bairros**. 2012a. Disponível em: <[http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/ipece-informe/Ipece\\_Informe\\_44\\_12\\_novembro\\_2012.pdf](http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/ipece-informe/Ipece_Informe_44_12_novembro_2012.pdf)>. Acesso em: 05 Dez. 2012.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ (IPECE). **Informe 47: Perfil Municipal de Fortaleza. Tema XI: Perfil do analfabetismo nos bairros**. 2012b. Disponível em: <[http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/ipece-informe/Ipece\\_Informe\\_47\\_03\\_dezembro\\_2012.pdf](http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/ipece-informe/Ipece_Informe_47_03_dezembro_2012.pdf)>. Acesso em: 05 Dez. 2012.

ISLAM, Z.; GILBERT, M.; MOHAMMAD, Q.D.; KLAIJ, K.; LI, J.; VAN RIJS, W.; *et al.* Guillain-Barré syndrome-related *Campylobacter jejuni* in Bangladesh: ganglioside mimicry and cross-reactive antibodies. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e43976, 2012.

ISRAELI, E.; AGMON-LEVIN, N.; BLANK, M.; CHAPMAN, J.; SHOENFELD, Y. Guillain-Barré syndrome – a classical autoimmune disease triggered by infection or vaccination. **Clin. Rev. Allergy Imunol.**, v. 42, n. 2, p. 121-130, 2012.

IVANOVA, K.; MARINA, M.; PETROV, P.; KANTARDJIEV, T. Campylobacteriosis and other bacterial gastrointestinal disease in Sofia, Bulgaria for the period 1987-2008. **Euro Surveill.**, v. 15, n. 4, p. 19474, 2010.

IWANAGA, K.; TOMINAGA, K.; YAMAMOTO, K.; HABU, M.; MAEDA, H.; AKIFUSA, S. *et al.* Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. **Cancer Gene Ther.**, v. 14, n. 4, p. 354-363, 2007.

JACKSON, B.R.; ZEGARRA, J.A.; LÓPEZ-GATELL, H.; SEJVAR, J.; ARZATE, F.; WATERMAN, S. *et al.* Binational outbreak of Guillain Barré syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection, Mexico and USA, 2011. **Epidemiol. Infect.**, v. 7, p. 1-11, 2013.

JACKSON, D.N.; DAVIS, B.; TIRADO, S.M.; DUGGAL, M.; VAN FRANKENHUYSEN, J.K.; DEAVILLE, D.; *et al.* Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v. 96, n. 4, p. 377-394, 2009. doi: 10.1007/s10482-009-9378-8.

- JAFARI, F.; GARCIA-GIL, L.J.; SALMANZADEH-AHRABI, S.; SHOKRZADEH, L.; ASLANI, M.M.; POURHOSEINGHOLI, M.A.; *et al.* Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. **J. Infect.**, v. 58, p. 21-27, 2009.
- JANSSEN, R.; KROGFELT, K.A.; CAWTHRAW, S.A.; VAN PELT, W.; WAGENAAR, J.A.; OWEN, R.J. Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 3, p. 505-518, 2008.
- JESS, T.; SIMONSEN, J.; NIELSEN, N.M.; JØRGENSEN, K.T.; BAGER, P.; ETHELBERG, S.; FRISCH, M. Enteric *Salmonella* or *Campylobacter* infections and the risk of inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 60, p. 318-324, 2011.
- JIMENEZ, S.G.; HEINE, R.G.; WARD, P.B.; ROBINS-BROWNE, R.M. *Campylobacter upsaliensis* gastroenteritis in childhood. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 18, n. 11, p. 988-992, 1999.
- JINADASA, R.N.; BLOOM, S.E.; WEISS, R.S.; DUHAMEL, G.E. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. **Microbiology**, v. 157, p. 1851-1875, 2011.
- JOHANESEN, P.A.; DWINELL, M.B. Flagellin-independent regulation of chemokine host defense in *Campylobacter jejuni*-infected intestinal epithelium. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 6, p. 3437-3447, 2006.
- JOLLEY, K.A.; MAIDEN, M.C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 595, 2010. doi: 10.1186/1471-2105-11-595.
- KABORÉ, H.; MICHEL, P.; LAVALLOIS, P.; DÉRY, P.; PAYMENT, P.; LEBEL, G. A descriptive review of selected nonviral enteric illnesses reported in children in Quebec between 1999 and 2006. **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.**, v. 21, p. e92-e98, 2010.
- KAKAI, R.; WALMOLE, I. A.; BWAYO, J. J.; NDINYA-ACHOLA, J. O. Enteric pathogens in malnourished children with diarrhoea. **East Afr. Med. J.**, v. 72, n. 5, p. 288-289, 1995.
- KALISCHUK, L.D.; BURET, A.G. A role for *Campylobacter jejuni*-induced enteritis in inflammatory bowel disease? **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 298, p. G1-G9, 2010.
- KALRA, V.; CHAUDRY, R.; DUA, T.; DHAWAN, B.; SAHU, J.K.; MRIDULA, B. Association of *Campylobacter jejuni* infection with childhood Guillain-Barré syndrome: a case-control study. **J. Child Neurol.**, v. 24, n. 6, p. 664-668, 2009.
- KASSEM, I.I.; CHANDRASHEKHAR, K.; RAJASHEKARA, G. Of energy and survival incógnito: a relationship between viable but non-culturable cells formation and inorganic polyphosphate and formate metabolism in *Campylobacter jejuni*. **Front Microbiol.**, v. 4, n. 183, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00183.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of TLRs, RLRs, and NLRs in pathogen recognition. **Int. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 317-337, 2009.

KELLER, L.; COHEN-BACRIE, S.; PRÉRE, M.F. Evaluation of three rapid assays for direct diagnosis of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from stools. **Pathol. Biol. (Paris)**, v. 59, n. 1, p. 16-18, 2011.

KENDALL, M.E.; CRIM, S.; FULLERTON, K.; CRONQUIST, A.B.; SHIFERAW, B.; INGRAM, L.A. *et al.* Travel-associated enteric infections diagnosed after return to the United States, Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004-2009. **Clin. Infect. Dis.**, Suppl. 5, p. S480-S487, 2012. doi: 10.1093/cid/cis052.

KEO, T.; COLLINS, J.; KUNWAR, P.; BLASER, M.J.; IOVINE, N.M. *Campylobacter* capsule and lipooligosaccharide confer resistance to serum and cationic antimicrobials. **Virulence**, v. 2, n. 1, p. 30-40, 2011.

KIRKPATRICK, B.D.; TRIBBLE, D.R. Update on human *Campylobacter jejuni* infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2011.

KOEHLER, K.M.; LASKY, T.; FEIN, S.B.; DELONG, S.M.; HAWKINS, M.A.; RABATSKY-EHR, T.; *et al.* Population-based incidence of infection with selected bacterial enteric pathogens in children younger than five years of age, 1996-1998. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 2, p. 129-134, 2006.

KOLLING, G.; WU, M.; GUERRANT, R.L. Enteric pathogens through life stages. **Front Cell Infect. Microbiol.**, v. 2:114, 2012. doi: 10.3389/fcimb.2012.00114.

KONKEL, M.E.; KIM, B.J.; KLENA, J.D.; YOUNG, C.R.; ZIPRIN, R. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 8, p. 3666-3672, 1998.

KONKEL, M.E.; KIM, B. J.; RIVERA-AMILL, V.; GARVIS, S.G. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. **Mol. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 691-701, 1999.

KONKEL, M.E.; KLENA, J.D.; RIVERA-AMILL, V.; MONTEVILLE, M.R.; BISWAS, D.; RAPHAEL, B.; MICKELSON, J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 11, p. 3296-3303, 2004.

KOSEK, M.; HAQUE, R.; LIMA, A.; BABJI, S.; SHRESTHA, S.; QURESHI, S.; *et al.* Fecal markers of intestinal inflammation and permeability associated with the subsequent acquisition of linear growth deficits in infants. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 2, p. 390-396, 2013. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0549

KOTLOFF, K.; NATARO, J.P.; BLACKWELDER, W.C.; NASRIN, D.; FARAQ, T.H.; PANCHALINGAM, S. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

- KOWNHAR, H.; SHANKAR, E.M.; RAJAN, R.; VENGATESAN, A.; RAO, U.A. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and enteric bacterial pathogens among hospitalized HIV infected versus non-HIV infected patients with diarrhea in southern India. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 39, n. 10, p. 862-866, 2007.
- KRAMER, M.S.; KAKUMA, R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. **Cochrane Database Syst Rev.**, n. 8, CD003517, 2012.
- KRISHNA, N.K.; CUNNION, K.M. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies. **Med. Clin. North Am.**, v. 96, n. 6, p. 1067-1078, 2012.
- KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.; SALLE, C.T.; NASCIMENTO, V.P. Occurrence and characterization of *Campylobacter* in the Brazilian production and processing of broilers. **Avian Dis.**, v. 52, n. 4, p. 680-684, 2008.
- KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.**, v. 27, p. 95-125, 2006.
- KWAN, P.S.; BARRIGAS, M.; BOLTON, F.J.; FRENCH, N.P.; GOWLAND, P.; KEMP, R.; *et al.* Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* populations in dairy cattle, wildlife, and the environment in a farmland area. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 16, p. 5130-5138, 2008.
- LARA-TEJERO, M.; GÁLAN, J.E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyxiribonuclease I-like protein. **Science**, v. 290, n. 5490, p. 354-357, 2000.
- LARA-TEJERO, M.; GÁLAN, J.E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4358-4365, 2001.
- LARSEN, J.K.; GRADEL, K.O.; HELMS, M.; HORNSTRUP, M.K.; JÜRGENS, G.; MENS, H.; *et al.* Non-typhoidal Salmonella and *Campylobacter* infections among HIV-positive patients in Denmark. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 43, n. 1, p. 3-7, 2011.
- LASSEN, J.; KAPPERUD, G. Epidemiological aspects of enteritis due to *Campylobacter* spp. in Norway. **J. Clin. Microbiol.**, v. 19, n. 2, p. 153-156, 1984.
- LAURIA-FILGUEIRAS, A.L.; HOFER, E. Diversity of *Campylobacter* isolates from three activated sludge systems. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 295-298, 1998.
- LEE, G.; PAN, W.; PEÑATARO, Y.P.; PAREDES OLORTEGUI, M.; TILLEY, D.; GREGORY, M.; *et al.* Symptomatic and asymptomatic *Campylobacter* infections associated with reduced growth in Peruvian children. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 1, e2036, 2013. doi: 10.1371/journal.pntd.0002036.
- LEE, M.D.; NEWELL, D.G. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. **Avian Dis.**, v. 50, n. 1, p. 1-9, 2006.
- LEHOURS, P.; ALADJIDI, N.; SARLANGUE, J.; MÉGRAUD, F. *Campylobacter* infections in children. **Arch. Pediatr.**, v. 19, n. 6, p. 629-634, 2012.

LEONARD, E.E. 2nd; TOMPKINS, L.S.; FALKOW, S.; NACHAMKIN, I. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates implicated in Guillain-Barré syndrome and strains that cause enteritis by a DNA microarray. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 2, p. 1199-1203, 2004.

LEVINE, M.M.; ROBINS-BROWNE, R.M. Factors that explain excretion of enteric pathogens by persons without diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, Suppl. 4, p. S303-311, 2012. doi: 10.1093/cid/cis789.

LI, X.; SWAGGERTY, C.L.; KOGUT, M.H.; CHAING, H.I.; WANG, Y.; GENOVESE, K.J. *et al.* Gene expression of the local cecal response of genetic chicken lines that differ in their susceptibility to *Campylobacter jejuni* colonization. **PLoS One**, v. 5, n. 7, e11827, 2010.

LIMA, A.A.; FANG, G.; SCHORLING, J.B.; DE ALBUQUERQUE, L.; MCAULIFFE, J.F.; MOTA, S.; LEITE, R.; GUERRANT, R.L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39-44, 1992.

LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Persistent diarrhea in children: epidemiology, risks factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiol. Rev.**, v. 14, p. 222-242, 1992.

LIMA, A.A.; MOORE, S.R.; BARBOZA Jr, M.S.; SOARES, A.M.; SCHLEUPNER, M.A.; NEWMAN, R.D.; *et al.* Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1643-1651, 2000.

LIMA, A.A. Tropical diarrhoea: new developments in traveller's diarrhea. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 5, p. 547-552, 2001.

LIMA, I.F.N.; BOISEN, N.; QUETZ, J.S.; HAVT, A.; CARVALHO, E.B.; SOARES, A. M.; *et al.* Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children Northeastern Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, Pt. 5), p. 683-693, 2013a.

LIMA, I.F.N.; QUETZ, J.S.; GUERRANT, R.L.; NATARO, J.P.; HOUP, E.R.; LIMA, A.A.; HAVT, A. Enteroaggregative *Escherichia coli* quantification in children stool samples using quantitative PCR. **APMIS**, v. 121, n. 7, p. 643-651, 2013b. doi: 10.1111/apm.12032.

LIN, J. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 6, n. 7, p. 755-765, 2009.

LINDSAY, B.; POP, M.; ANTONIO, M.; WALKER, A.W.; MAI, V.; AHMED, D. Alternative methods of bacterial pathogen detection: Culture, GoldenGate®, Universal Biosensor®, 16S rRNA-gene survey. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 10, p. 3263-3269, 2013.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE (LPSN). Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>. Acesso em: 13 Aug. 2013.

LIU, J.; KIBIKI, G.; MARO, V.; MARO, A.; KUMBURU, H.; SWAI, N. *et al.* Multiple reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. **J. Clin. Virol.**, v. 50, n. 1, p. 308-313, 2011.

LIU, J.; GRATZ, J.; MARO, A.; KUMBURU, H.; KIBIKI, G.; TANIUCHI, M.; *et al.* Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 98-103, 2012.

LLOYDE-EVANS, N.; DRASAR, B. S.; TOMKINS, A. M. A comparison of the prevalence of *Campylobacter*, *Shigellae* and *Salmonellae* in faeces of malnourished and well-nourished children in the Gambia and Northern Nigeria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 2, p. 245-247, 1983.

LONGENBERGER, A.H.; PALUMBO, A.J.; CHU, A.K.; MOLL, M.E.; WELTMAN, A.; OSTROFF, S.M. *Campylobacter jejuni* infections associated with unpasteurized milk – Multiple States, 2012. **Clin. Infect. Dis.**, v. 57, n. 2, p. 263-266, 2013.

LOUWEN, R. P. L.; VAN BELKUM, A.; WAGENAAR, J. A.; DOORDUYN, Y.; ACHTERBERG, R.; ENDTZ, H. P. Lack of association between the presence of the *pVir* plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1867–1868, 2006.

LOUWEN, R.; HEIKEMA, A.; VAN BELKUM, A.; OTT, A.; GILBERT, M.; ANG, W.; *et al.* The sialylated lipooligosaccharide outer core in *Campylobacter jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 10, p. 4431-4438, 2008.

M'IKANATHA, N.M.; DETTINGER, L.A.; PERRY, A.; ROGERS, P.; REYNOLDS, S. M.; NACHAMKIN, I. Culturing stool specimens of *Campylobacter* spp., Pennsylvania, USA. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, n. 3, p. 484-487, 2012.

MACCALLUM, A.; HARDY, S.P.; EVEREST, P.H. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. **Microbiology**, v. 151, p. 2451-2458, 2005.

MAHENDRAKER, A.G.; DUTTA, P.K.; URMIL, A.C.; MOORTHY, T.S. A study of medico social profile of under five children suffering from diarrhoeal diseases. **Indian J. Matern. Child Health**, v. 2, n. 4, p. 127-130, 1991.

MAHER, M.; FINNEGAN, C.; COLLINS, E.; WARD, B.; CARROL, C.; CORMICAN, M. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 2980-2986, 2003.

MAL-ED: The interactions of malnutrition and enteric infections: consequences for child health and development, USA. 2012. Disponível em: <<http://mal-ed.fnih.org/>>. Acesso em: 28 May 2012.

MALIK-KALE, P.; PARKER, C.T.; KONKEL, M.E. Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 7, p. 2286-2297, 2008.

MAN, S.M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, n.12, p. 669-685, 2011.

MANDEVILLE, K.L.; KRABSHUIS, J.; LADEP, N.G.; MULDER, C.J.J.; QUIGLEY, E.M.M.; KHAN, S.A. Gastroenterology in developing countries: Issues and advances. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 23, p. 2839-2854, 2009.

MANGIA, A.H.; DUARTE, A.N.; DUARTE, R.; SILVA, L.A.; BRAVO, V.L.; LEAL, M.C. Aetiology of acute diarrhoea in hospitalized children in Rio de Janeiro city, Brazil. **J. Trop. Pediatr.**, v. 39, n. 6, p. 365-367, 1993.

MARRIOTT, I.; HUET-HUDSONM, Y.M. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. **Immunol. Res.**, v. 34, n. 3, p. 177-192, 2006.

MARSHAL, J.K.; THABANE, M.; GARG, A.X.; CLARK, W.F.; MOAYYEDI, P.; COLLINS, S.M.; *et al.* Eight year prognosis of postinfectious irritable bowel syndrome following waterborne bacterial dysentery. **Gut**, v. 59, n. 5, p. 605-611, 2010.

MARTIN, P.M.; MATHIOT, J.; IPERO, J.; KIRIMAT, M.; GEORGES, A.J.; GEORGES- COUBOT, M.C. Immune response to *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in a cohort of children from birth to 2 years of age. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 8 p. 2542-2546, 1989.

MAUE, A.C.; MOHAWK, K.L.; GILES, D.K.; POLY, F.; EWING, C.P.; JIAO, Y. *et al.* The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. **Infect. Immun.**, v. 81, n. 3, p. 665-672, 2013.

MEDEIROS, M.I.; NEME, S.N.; DA SILVA, P.; CAPUANO, D.M.; ERRERA, M.C.; FERNANDES, S.A.; *et al.* Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirão Preto – SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 21-24, 2001.

MEDZHITOV, R. Approaching the asymptote: 20 years later. **Immunity**, v. 30, n. 6, p. 766-775, 2009.

MEDZHITOV, R. Innovating immunology: an interview with Ruslan Medzhitov. **Dis. Model. Mech.**, v. 4, n. 4, p. 430-432, 2011.

MEDZHITOV, R.; SCHENEIDER, D.S.; SOARES, M.P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**, v.335, n. 6071, p. 936-941, 2012.

MELO, M.C.; TADDEI, J.A.; DINIZ-SANTOS, D.R.; VIEIRA, C.; CARNEIRO, N.B.; MELO, R.F.; SILVA, L.R. Incidence of diarrhea in children living in urban slums in Salvador, Brazil. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 13, n. 5, p. 402-407, 2008.

MENDES, E.N., QUEIROZ, D.M.M., CISALPINO, E.O., PERES, J.N., PENNA, F.J., FIGUEIREDO-FILHO, P.P. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in children with or without diarrhea, in Belo Horizonte. **Rev. Microbiol. Soc. Bras. Med.**, v. 181, n.1, p. 25-30, 1987.



MENDES, P.S.A.; RIBEIRO, H.C.; MENDES, C.M.C. Tendência temporal da mortalidade geral por doença diarreica em crianças brasileiras menores de cinco anos no período de 2000 a 2010. **J. Pediatr. (Rio J)**, v. 89, p. 315-325, 2013.

MOAWEED, S.A.; SAEED, A.A. Knowledge and practices of mothers about infant's diarrheal episodes. **Saudi Med. J.**, v. 21, n. 12, p. 1147-1151, 2000.

MOHRAN, Z. S.; ARTHUR, R. R.; OYOFO, B. A.; PERUSKI, L. F.; WASFY, M. O.; ISMAIL, T. F.; MURPHY, J. R. Differentiation of *Campylobacter* isolates on the basis of sensitivity to boiling in water as measured by PCR-detectable DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 1, p. 363-365, 1998.

MOLBAK, K.; HOJLYNG, N.; GAARSLEV, K. High prevalence of *Campylobacter* excretors among Liberian children related to environmental conditions. **Epidemiol. Infect.**, v. 100, n. 2, p. 227-237, 1998.

MOORE, S.R.; LIMA, N.L.; SOARES, A.M.; ORIÁ, R.B.; PINKERTON, R.C.; BARRET, L.J. *et al.* Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. **Gastroenterol.**, v. 139, n. 4, p. 1156-1164, 2010.

MORENO, A.C.; FILHO, A.F.; GOMES, T.A.; RAMOS, S.T.; MONTEMOR, L.P.; TAVARES, V.C.; *et al.* Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

MORI, M.; KUWABARA, S.; YUKI, N. Fisher syndrome: clinical features, immunopathogenesis and management. **Expert Rev. Neurother.**, v. 12, n. 1, p. 39-51, 2012.

MORTENSEN, N.P.; KUIJF, M.L.; ANG, C.W.; SCHIELLERUP, P.; KROGFELT, K.A.; JACOBS, B.C.; *et al.* Sialylation of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides is associated with severe gastroenteritis and reactive arthritis. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 12, p. 988-994, 2009.

MORTENSEN, N.P.; SCHIELLERUP, P.; BOISEN, N.; KLEIN, B.M.; LOCHT, H.; ABUOUN, M.; NEWELL, D.; KROGFELT, K.A. The role of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin in gastroenteritis: toxin detection, antibody production, and clinical outcome. **APMIS**, v. 119, n. 9, p. 626-634, 2011.

MOTA, M.L.; GADEA, M.P.; GONZÁLEZ, G.; PARDO, L.; SIROK, A.; RIVAS, M.; ALGORTA, G.; SCHELOTTO, F.; VARELA, G. Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 114-117, 2010.

MSHANA, S.E.; JOLOBA, M.; KAKOOZA, A.; KADDU-MULINDWA, D. *Campylobacter* spp. Among children with acute diarrhea attending Mulago hospital in Kampala – Uganda. **Afr. Health Sci.**, v. 9, n. 3, p. 201-205, 2009.

MURPHY, D.; JOLLY, C.; MACDONALD, S.; TROUGHTON, R. Myocarditis associated with *Campylobacter jejuni*. **N. Z. Med. J.**, v. 126, n. 1375, p. 95-98, 2013.

MUSHER, D.M.; MUSHER, B.L. Contagious acute gastrointestinal infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 23, p. 2417-27, 2004.

NAKAMURA, S.; MAEDA, N.; MIRON, I.M.; YOH, M.; IZUTSU, K.; KATAOKA, C. *et al.* Metagenomic diagnosis of bacterial infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 11, p. 1784-1786, 2008. doi: 10.3201/eid1411.080589.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. **NINDS Guillain-Barré Syndrome Fact Sheet**. 2011a. Disponível em: < [http://www.ninds.nih.gov/disorders/gbs/detail\\_gbs.htm](http://www.ninds.nih.gov/disorders/gbs/detail_gbs.htm) > Acesso em: 05 Aug. 2013.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. **NINDS Miller Fisher Syndrome Information Page**. 2011b. Disponível em: < [http://www.ninds.nih.gov/disorders/miller\\_fisher/miller\\_fisher.htm](http://www.ninds.nih.gov/disorders/miller_fisher/miller_fisher.htm) > Acesso em: 05 Aug. 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **BLAST: Basic Local Alingment Search Tool**. 2013. Disponível em:< <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 16 Jan. 2013.

NAVANEETHAN, U.; GIANELLA, R.A. Infectious colitis. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 27, n. 1, p. 66-71, 2011.

NELSON, W.; HARRIS, B. Campylobacteriosis rate show age-related static bimodal and seasonality trends. **N. Z. Med. J.**, v. 124, n. 1337, p. 33-39, 2011.

NEVES, M.A.O.; MELLO, M.P.; REIS, J.P.B.; ANTONIOLI, R.S.; SANTOS, V.V.; FREITAS, M.R.G. Síndrome de Guillain-Barré na infância: relato de caso. **Rev. Neurociên.**, v. 15, n. 4, p. 329-333, 2007.

NICHOLS, G.L. Fly transmission of *Campylobacter*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 3, p. 136-364, 2005.

NIEHAUS, M.D.; MOORE, S.R.; PATRICK, P.D.; DERR, L.L.; LORNTZ, B.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantitown. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 5, p. 590-593, 2002.

NIELSEN, H.; STEFFENSEN, R.; EJLERTSEN, T. Risk and prognosis of campylobacteriosis in relation to polymorphisms of host inflammatory cytokines genes. **Scand. J. Immunol.**, v.75, p. 449-454, 2012. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02678.x.

NIELSEN, L.N.; LUIJKX, T.A.; VEGGE, C.S.; JOHNSEN, C.K.; NUIJTEN, P.; WREN, B.M; *et al.* Identification of immunogenic and virulence-associated *Campylobacter jejuni* proteins. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 113-119, 2012.

NOTHAFT, H.; SZYMANSKI, C.M. Protein glycosylation in bactéria: sweeter than ever. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 11, p. 765-778, 2010. doi:10.1038/nrmicro2383

NYATI, K.K.; PRASAD, K.N.; VERMA, A.; SINGH, A.K.; RIZWAN, A.; SINHA, S. *et al.* Association of TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with Guillain-Barré syndrome in Northern Indian population. **J. Neuroimmunol.**, v. 218, n. 1/2, p. 116-119, 2010.

NYATI, K.K.; NYATI, R. Role of *Campylobacter jejuni* infection in the pathogenesis of Guillain-Barré syndrome: an update. **Biomed. Res. Int.**, v.2013, ID:852195, 2013.

ON, S.L.W. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? **J. Microbiol. Meth.**, v. 95, n. 1, p. 3-7, 2013.

ON, S.L.W.; BRANDT, S.M.; CORNELIUS, A.J.; FUSCO, V.; QUECO, G.M.; MÁCKIW, E. *et al.* PCR revisited: a case for revalidation of PCR assays for microorganisms using identification of *Campylobacter* species as an exemplar. **Qual. Assur. Saf. Crops Foods**, v. 5, n. 1, p. 49-62, 2013. doi: 10.3920/QAS2012.0158

ONO, K.; YAMAMOTO, K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 47, n. 3, p. 211-219, 1999.

OP DEN WINKEL, M.; GULBERG, V.; WEISS, M.; EBELING, F.; GERBES, A.L.; SAMTLEBEN, W. Acute postinfectious glomerulonephritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis – a case report and review of the literature on *C. jejuni*'s potential to trigger immunologically mediated renal disease. **Clin. Nephrol.**, v. 74, n. 6, p. 474-479, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Department of Communicable Disease Surveillance and Response. **The increasing incidence of human Campylobacteriosis: Report and proceeding of a WHO consultation of experts.** 2001. Disponível em: < [http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_cds\\_csr\\_aph\\_2001.7.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_cds_csr_aph_2001.7.pdf) > Acesso em: 14 May 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The global burden of disease:** 2004 update. Geneva, 2004. Disponível em: < [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_report\\_2004update\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf)>. Acesso em: 9 July 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Health topics. **Diarrhoea.** Geneva, 2013a. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/campylobacter/en/> >. Acesso em: 29 July 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Health topics. **Diarrhoea.** Geneva, 2013b. Disponível em: < <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/> > Acesso em: 29 July 2013.

OYOFO, B.A.; THORNTON, S.A.; BURR, D.H.; TRUST, T.J.; PAVLOVSKIS, O.R.; GUERRY, P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 10, p. 2613-2619, 1992.

PAI, S.ST2.; RYTINA, E.; STERLING, J.; KARAS, J.A.; ALIYU, S. *Campylobacter* gastroenteritis associated with Sweet's syndrome. **J. Med. Microbiol.**, v.61, n.10, p. 1473-1475, 2012.

PALMA, D.; OLIVA, C.A.; TADDEI, J.A.; FAGUNDES-NETO, U. Acute diarrhea: stool water loss in hospitalized infants and its correlation with etiologic agentes and lactose content in the diet. **Arq. Gastroenterol.**, v. 34, n. 3, p. 186-195, 1997.

PANDEY, A.; SENGUPTA, P.G.; MONDAL, S.K.; GUPTA, D.N.; MANNA, B.; GHOSH, S.; *et al.* Gender differences in healthcare-seeking during common illnesses in a rural community of West Bengal, India. **J. Health Popul. Nutr.**, v. 20, n. 4, p. 306-311, 2002.

PARKHILL, J.; WREN, B.W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J.M.; CHURCHER, C.; BASHAM, C.; *et al.* The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 665-668, 2000.

PATRICK, P.D.; ORIÁ, R.B.; MADHAVAN, V.; PINKERTON, R.C.; LORNTZ, B.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Limitations in verbal fluency following heavy burdens of early childhood diarrhea in Brazilian shantytown children. **Child Neuropsychol.**, v. 11, n. 3, p. 233-244, 2005.

PAZZAGLIA, G.; BOUGEOIS, A.L.; EL DIWANY, K.; NOUR, N.; BADRAN, N.; HABLAS, R.. *Campylobacter* diarrhoea and an association of recent disease with asymptomatic shedding in Egyptian children. **Epidemiol. Infect.**, v. 106, n. 1, p. 22977-82, 1991.

PAZZAGLIA, G.; BOUGEOIS, A.L.; MOURAD, A.S.; GAAFAR, T.; DIAB, A.S.; HEBERT, A.; *et al.* *Campylobacter* diarrhea in Alexandria, Egypt. **J. Egypt Public Health Assoc.**, v. 70, n. 3-4, p. 229-241, 1995.

PENNER, J.L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, n. 2, p. 157-172, 1988.

PETRI Jr., W.A. Sulfonamides, Thrimethoprim-Sulfatmethoxazole, Quinolones, and Agents for Urinary Tract Infections). In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw-Hill Medicine, 2005. cap. 43.

PERIO, M.A.; NIEMEIER, R.T.; LEVINE, S.J.; GRUSZYNSKI, K.; GIBBINS, J.D. *Campylobacter* infection in poultry-processing workers, Virginia, USA, 2008-2011. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 19, n. 2, p. 286-288, 2013.

PIKE, B.L.; GUERRY, P.; POLY, F. Global distribution of *Campylobacter jejuni* Penner serotypes: a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 6, e67375, 2013.

PINHEIRO, R.S.; VIACAVA, F.; TRAVASSOS, C.; BRITO, A.S. Gênero, morbidade, acesso e utilização de serviços de saúde no Brasil. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 7, n. 4, p. 687-707, 2002.

PLATTS-MILLS, J.A.; LIU, J.; HOUP, E.R. New concepts in diagnostics for infectious diarrhea. **Mucosal Immunol.**, v. 6, p. 876-885, 2013.

PLATTS-MILLS, J.A.; OPERARIO, D.J.; HOUP, E.R. Molecular diagnosis of diarrhea: current status and future potential. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 14, p. 41-46, 2012.

PODEWILS, L. J.; MINTZ, E. D.; NATARO, J. P.; PARASHAR, U. D. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 155-168, 2004.

POLY, F.; THREADGILL, D.; STINTZI, A. Identification of *Campylobacter jejuni* ATCC 43431-specific genes by whole microbial genome comparisons. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 14, p. 4781-4795, 2004.

POLY, F.; THREADGILL, D.; STINTZI, A. Genomic diversity in *Campylobacter jejuni*: identification of *C. jejuni* 81-176-specific genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 2330-2338, 2005.

POKHREL, S.; SNOW, R.; DONG, H.; HIDAYAT, B.; FLESSA, S.; SAUERBORN, R. Gender role and child health care utilization in Nepal. **Health Policy**, v. 74, n. 1, p. 100-109, 2005.

POLY, F.; READ, T.; TRIBBLE, D.R.; BAQAR, S.; LORENZO, M.; GUERRY, P. Genome sequence of a clinical isolate of *Campylobacter jejuni* from Thailand. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 7, p. 3425-3433, 2007.

POPE, J.E.; KRIZOVA, A.; GARG, A. X.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; OUIOMET, J.M. *Campylobacter* reactive arthritis: a systemic review. **Semin.Arthritis Rheum.**, v. 37, p. 48-55, 2007.

POROPATICH, K.O.; WALKER, C.L.; BLACK, R.E. Quantifying the association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: a systematic review. **J. Health Popul. Nutr.**, v. 28, n. 6, p. 545-552, 2010.

POTTER, R.C.; KANEENE, J.B.; GARDINER, J. A comparison of *Campylobacter jejuni* enteritis incidence rates in high- and low-poultry-density counties: Michigan 1992-1999. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 2, n. 3, p. 137-143, 2002.

PROCTER, T.D.; PEARL, D.L.; FINLEY, R.L.; LEONARD, E.K.; JANECKO, N.; REID-SMITH, R.J. *et al.* A cross-sectional study examining *Campylobacter* and other zoonotic enteric pathogens in dogs that frequent dog parks in three cities in South western Ontario and risk factors for shedding of *Campylobacter* spp. **Zoonoses Public Health**, 2013. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/zph.12062.

QUETZ, J. da S. **Estudo sobre *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em crianças da área urbana de Fortaleza, Ceará / Brasil**: identificação genética, inflamação intestinal e impacto no estado nutricional. 2009. 145 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

QUETZ, J. S.; LIMA, I. F. N.; HAVT, A.; CARVALHO, E. B.; LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; *et al.* *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 67, n. 3, p. 220-227, 2010. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.025

QUETZ, J. S.; LIMA, I. F. N.; HAVT, A.; PRATA, M. M. G; CAVALCANTE, P. A.; MEDEIROS, P. H. Q. S. *et al.* *Campylobacter jejuni* infection and its virulence associated genes among children with moderate to severe diarrhea attended at emergency rooms in Northeastern Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 507-513, 2012. doi: 10.1099/jmm.0.040600-0

QUINLAN, J.J. Foodborne illness incidence rates and food safety risks for population of low socioeconomic status and minority race/ethnicity: a review of literature. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 10, p. 3634-3652, 2013.

RAJENDRAN, P.; BABJI, S.; GEORGE, A.T.; RAJAN, D.P.; KANG, G.; AJJAMPUR, S.S. Detection and species identification of *Campylobacter* in stool samples of children and animals from Vellore, south India. **Indian J. Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 85-88, 2012. doi: 10.4103/0255-0857.93049.

RANDREMANANA, R.; RANDRIANIRINA, F.; GOUSSEF, M.; DUBOIS, N.; RAZAFINDRATSIMANDRESY, R.; HARINIANA, E.R. *et al.* Case-control study of the etiology of infant diarrheal disease in 14 districts in Madagascar. **PLoS One**, v. 7, n. 9, e44533, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0044533.

RAO, M.R.; NAFICY, A.B.; SAVARINO, S.J.; ABU-ELYAZEED, R.; WIERZBA, T.F.; PERUSKI, L.F.; *et al.* Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. **Am. J. Epidemiol.**, v. 154, n. 2, p. 166-173, 2001.

RECHENBURG, A.; KISTEMANN, T. Sewage effluent as a source of *Campylobacter* sp. in a surface water catchment. **Int. J. Environ. Health Res.**, v. 19, n. 4, p. 239-249, 2009.

REED, R.P.; FRIEDLAND, I.R.; WEGERHOFF, F.O.; KHOOSAL, M. *Campylobacter* bacteremia in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 15, n. 4, p. 345-348, 1996.

REES, L.E.; COGAN, T.A.; DODSON, A.L.; BIRCHALL, M.A.; BAILEY, M.; HUMPHREY, T.J. *Campylobacter* and IFN-gamma interact to cause rapid loss of epithelial barrier integrity. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 14, n. 3, p. 303-309, 2008.

RESCIGNO, M.; DI SABATINO, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 9, p. 2441-2450, 2009. doi: 10.1172/JCI39134.

RHEINGANS, R.; KUKLA, M.; ADEGBOLA, R.A.; SAHA, D.; OMORE, R.; BREIMAN, R.F. *et al.* Exploring household economic impacts of childhood diarrhea illnesses in 3 African settings. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, Suppl. 4, p. S317-S326, 2012a. doi: 10.1093/cid/cis763.

RHEINGANS, R.; KUKLA, M.; FARUQUE, A.S.; SUR, D.; ZAIDI, A.K.; NASRIN, D.; *et al.* Determinants of household costs associated with childhood diarrhea in 3 South Asian settings. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55, Suppl. 4, p. S327-S335, 2012b. doi: 10.1093/cid/cis764.

RICCIARD, I.D.; FERREIRA, M.C.; OTTO, S.S.; OLIVEIRA, N.; SABRÁ, A.; FONTES, C.F. Thermophilic *Campylobacter*-associated diarrhoea in Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.**, v. 12, n. 2-3, p. 189-191, 1979.

RIDDLE, M.S.; GUTIERREZ, R.L.; VERDU, E.F.; PORTER, C.K. The chronic gastrointestinal consequences associated with *Campylobacter*. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 14, n. 5, p. 395-405, 2012.

RIPABELLI, G.; TAMBURRO, M.; MINELLI, F.; LEONE, A.; SAMMARCO, M.L. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 33, p. 355-364, 2010.

ROCHA, M.S.; BRUCKI, S.M.; CARVALHO, A.A.; LIMA, U.W. Epidemiologic features of Guillain-Barré syndrome in São Paulo, Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 62, n. 1, p. 33-37, 2004.

ROLLINS, D.M.; COLWELL, R.R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 52, n. 3, p. 531-538, 1986.

ROSE, A.; KAY, E.; WREN, B.W.; DALLMAN, M.J. The *Campylobacter jejuni* NCTC11168 capsule prevents excessive cytokine production by dendritic cells. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 201, n. 2, p. 137-144, 2012.

ROZYNEK, E.; ANTOS-BIELSKA, M.; DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K.; SZCZEPANSKA, B.; TRAFNY, E.A. Genetic similarity of *Campylobacter* isolates in humans, food, and water sources in central Poland. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 7, n. 5, p. 597-600, 2010.

RUEMMELE, F.M. Bacterial mucosa cross-talk and pathophysiology of inflammation. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 48, Suppl. 2, p. S49-S51, 2009.

RUIZ-PALACIOS, G.M.; CERVANTES, L.E.; RAMOS, P.; CHAVEZ-MUNQUIA, B.; NEWBURG, D.S. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H (O) antigen (Fuc alpha 1,2 Gal beta 1,4 GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibits its binding and infection. **J. Biol. Biochem.**, v. 278, n. 16, p. 14112-14120, 2003.

RUIZ-PALACIOS, G.M. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 5, p. 701-703, 2007.

SACCHI, C.T.; FUKASAWA, L.O.; GONÇALVES, M.G.; SALGADO, M.M.; SHUTT, K.A.; CARVALHANAS, T.R.; *et al.* Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, n. 6, e20675, 2011.

SAHIN, O.; MORISHITA, T.Y.; ZHANG, Q. *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 3, n. 2, p. 95-105, 2002.

SALDIVA, S.R.; VENANCIO, S.I.; GOUVEIA, A.G.; CASTRO, A.L.; ESCUDER, M.M.; GIUGLIANI, E.R. Regional influence on early consumption of foods other than breast milk in infants less than 6 months of age in Brazilian State capitals and the Federal district. **Cad. Saude Publica**, v. 27, n. 11, p. 2253-2262, 2011.

SANTANA, J.C.B.; GARCIA, P.C.R.; EINLOFT, P.R.; KIPPER, D.J.; CHIAPIN, M.L.; SKERYPCSAK, F. Distúrbios autonômicos na Síndrome de Guillain-Barré: experiência de 13 anos em UTI pediátrica. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 72, n. 1, p. 20-26, 1996.

SARTOR, R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-594, 2008.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; HARAKAVA, R.; MIYASHIRO, S.; FERNANDES, F.M.C.; FRANCISCO, W. *et al.* Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 378-382, 2005.

SCHWILLE-KIUNTKE, J.; ENCK, P.; ZENDLER, C.; KRIEG, M.; POLSTER, A.V.; KLOSTERHALFEN, S.; *et al.* Post infectious irritable bowel syndrome: follow-up of a patient cohort of confirmed cases of bacterial infection with *Salmonella* or *Campylobacter*. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, n. 11, p. e479-e488, 2011.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. **Campylobacter jejuni, B220/0248.**

Disponível em: < <http://www.sciencephoto.com/media/10936/enlarge> >. Acesso em: 28 Aug. 2012.

SENOK, A.C.; BOTTA, G.A. *Campylobacter* enteritis in the Arabian Gulf. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 3, n. 2, p. 74-82, 2009.

SHIN, E.; OH, Y.; KIM, M.; JUNG, J.; LEE, Y. Antimicrobial resistance patterns and corresponding Multilocus Sequence Types of the *Campylobacter jejuni* isolates from human diarrheal samples. **Microb. Drug Resist.**, v. 19, n. 2, p. 110-116, 2013.

SIEGESMUND, A.M.; KONKEL, M.E.; KLENA, D.J.; MIXTER, P.F. *Campylobacter jejuni* infection of differentiated THP-1 macrophages results in interleukin 1 beta release and caspase-1-independent apoptosis. **Microbiology**, v. 150, p. 561-569, 2004.

SIEMBIEDA, J.L.; MILLER, W.A.; BYRNE, B.A.; ZICCARDI, M.H.; ANDERSON, N.; CHOUICHA, N.; *et al.* Zoonotic pathogens isolated from wild animals and environmental samples at two California wildlife hospitals. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 238, n. 6, p. 773-783, 2011.

SILVA, L. A. **Pesquisa de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em espécimes fecais de crianças com diarreia aguda e sem diarreia.** 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

SIMA, L.C.; NG, R.; ELIMELECH, M. Modeling risk categories to predict the longitudinal prevalence of childhood diarrhea in Indonesia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 5, p. 884-891, 2013.

SINGH, H.; RATHORE, R.; SINGH, S.; CHEEMA, P.S. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of *Campylobacter jejuni* in food and faecal samples. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, p. 181-186, 2011.



SINHA, A.; SENGUPTA, S.; GUIN, S.; DUTTA, S.; GHOSH, S.; MUKHERJEE, P. *et al.* Culture independent real-time PCR reveals extensive polymicrobial diarrhoea cases in Kolkata, India. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 19, n. 2, p. 173-180, 2013.

SINHA, S.; PRASAD, K.N.; PRADHAN, S.; JAIN, D.; JHA, S. Detection of preceding *Campylobacter jejuni* infection by polymerase chain reaction in patients with Guillain-Barré syndrome. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, p. 342-346, 2004.

SINHA, S.; PRASAD, K.N.; JAIN, D.; PANDEY, C.M.; JHA, S.; PRADHAN, S. Preceding infections and anti-ganglioside antibodies in patients with Guillain-Barré syndrome: a single centre prospective case-control study. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, n. 3, p. 334-337, 2007.

SJÖGREN, E.; RUIZ-PALACIOS, G.; KAIJSER, B. *Campylobacter jejuni* isolations from Mexican and Swedish patients, with repeated symptomatic and/or asymptomatic diarrhoea episodes. **Epidemiol. Infect.**, v. 1021, n. 1, p. 47-57, 1989.

SKELLY, C.; WEINSTEIN, P. Pathogen survival trajectories: an eco-environmental approach to the modeling of human campylobacteriosis ecology. **Environ. Health Perspect.**, v. 111, n. 1, p. 19-28, 2003.

SKIRROW, M.B. *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. **Br. Med. J.**, v. 2, n. 6078, p. 9-11, 1977.

SKIRROW, M.B. John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 9, p. 1213-1217, 2006.

SKJOLAAS, K.A.; BURKEY, T.E.; DRITZ, S.S.; MINTON, J.E. Effects of *Salmonella enterica* serovars typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 111, n. 3/4, p. 199-209, 2006.

SMITH, A.; REACHER, M.; SMERDON, W.; ADAK, G.K.; NICHOLS, G.; CHALMERS, R.M. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, n. 6, p. 1141-1149, 2006.

SOBEL, J.; GOMES, T.A.; RAMOS, R.T.; HOEKSTRA, M.; RODRIGUE, D.; RASSI, V.; GRIFFIN, P.M. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal illness in children aged 12-59 months in São Paulo, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 11, p. 1545-1551, 2004.

SOOFI, S.B.; HABIB, M.A.; VON SEIDLEIN, L.; KHAN, M.J.; MUHAMMAD, S.; BHUTTO, N.; *et al.* A comparison of disease caused by *Shigella* and *Campylobacter* species: 24 months community based surveillance in 4 slums of Karachi, Pakistan. **J. Infect. Public Health**, v. 4, n. 1, p. 12-21, 2011.

SOROKIN, M.; USEIN, C.R.; IRIMIA, M.; DAMIAN, M. A laboratory-based survey of *Campylobacter* infections in Prahova County. **Roum. Arch. Microbiol. Immunol.**, v. 66, n. 3/4, p. 85-89, 2007.

- SPILLER, R.C. Role of infection in irritable bowel syndrome. **J. Gastroenterol.**, v. 42, p. 41-47, 2007.
- SPROSTON, E.L.; OGDEN, I.D.; MACRAE, M.; FORBES, K.J.; DALLAS, J.F.; SHEPPARD, S.K., et al. Multi-locus sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local ruminant faeces. **J. Appl. Microbiol.**, v. 109, n. 3, p. 829-838, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04711.x.
- STEPHENSON, H.N.; JOHN, C.M.; NAZ, N.; GUNDOGDU, O.; DORRELL, N.; WREN, B.M. et al. *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide sialylation, phosphorylation, and amide/ester linkage modifications fine tune human Toll-like receptor4 activation. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 27, p. 19661-19672, 2013.
- STRACHAN, N.J.C.; WATSON, R.O.; NOVIK, V.; HOFREUTER, D.; OGDEN, I.D.; GALÁN, J.E. Sexual dimorphism in campylobacteriosis. **Epidemiol. Infect.**, v. 136, n. 11, p. 1492-1495, 2008.
- STRID, M.A.; ENGBERG, J.; LARSEN, L.B.; BEGTRUP, K.; MOLBAK, K.; KROGFELT, K.A. Antibody responses to *Campylobacter* infections determined by an enzyme-linked immunosorbent assay: 2-year follow-up study of 210 patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, n. 2, p. 314-319, 2001.
- STUART, T.L.; SANDHU, J.; STIRLING, R.; CORDER, J.; ELLIS, A.; MISA, P.; et al. Campylobacteriosis outbreak associated with ingestion of mud during a mountain bike race. **Epidemiol. Infect.**, v. 138, n. 12, p. 1695-1703, 2010.
- SZYMANSKI, C.M.; LOGAN, S.M.; LINTON, D.; WREN, B.W. *Campylobacter* – a tale of two protein glycosylation systems. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 5, p. 233-238, 2003.
- TALUKDER, K.A.; ASLAM, M.; ISLAM, Z.; AZMI, I.J.; DUTTA, D.S.; HOSSAIN, S. et al. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 1485-1488, 2008.
- TAM, C.C.; RODRIGUES, L.C.; VIVIANI, L.; DODDS, J.P.; EVANS, M.R.; HUNTER, P.R.; et al. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. **Gut**, v. 61, n. 1, p. 69-77, 2012. doi: 10.1136/gut.2011.238386
- TEN VELDHUIS, J.A.; CLEMENS, F.H.; STERK, G.; BERENDS, B.R. Microbial risks associated with exposure to pathogens in contaminated urban flood water. **Water Res.**, v. 44, n. 9, p. 2910-2918, 2010.
- THEORET, J.R.; COOPER, K.K.; ZEKARIAS, B.; ROLAND, K.L.; LAW, B.F.; CURTISS, R. 3rd; JOENS, L.A. The *Campylobacter jejuni* Dps homologue is important for *in vitro* biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 19, n. 9, p. 1426-1431, 2012.

- THIBODEAU, A.; FRAVALO, P.; GARNEAU, P.; MASSON, L.; LAURENT-LEWANDOWSKI, S.; QUESSY, S. *et al.* Distribution of colonization and antimicrobial resistance genes in *Campylobacter jejuni* isolated from chicken. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 382-391, 2013.
- THOMPSON, S.A.; GAYNOR, E.C. *Campylobacter jejuni* host tissue tropism: a consequence of its low-carb lifestyle? **Cell Host Microbe.**, v. 4, n. 5, p. 409-410, 2008.
- THORNLEY, J.P.; JENKINS, D.; NEAL, K. Relationship of *Campylobacter* toxigenicity *in vitro* to the development of post-infectious inflammatory bowel syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 184, n. 5, p. 606-609, 2001.
- TOPOROVSKI, M.S.; MIMICA, I.M.; CHIEFFI, P.P.; PASCHOALOTTI, M.A.; DIAS, A.M.; SILVA, C.B. Acute diarrhea in children less than 3 years of age: Enteropathogens isolated in patients stools, compared with a control group. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 75, n. 2, p. 97-104, 1999.
- TRACZ, D. M.; KEELAN, M.; AHMED-BENTLEY, J.; GIBREEL, A.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; TAYLOR, D. E. pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 838-843, 2005.
- TRIBBLE, D.R.; BAQAR, S.; CARMOLLI, M.P.; PORTER, C.; PIERCE, K.K.; SADIGH, K.; *et al.* *Campylobacter jejuni* strain CG8421: a refined model for the study of campylobacteriosis and valuation of *Campylobacter* vaccines in human subjects. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, n. 10, p. 1512-1519, 2009.
- TRIBBLE, D.R.; BAQAR, S.; SCOTT, D.A.; OPLINGER, M.L.; TRESPALACIOS, F.; ROLLINS, D.; *et al.* Assessment of the duration of protection in *Campylobacter jejuni* experimental infection in humans. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 4, p. 1750-1759, 2010. doi: 10.1128/IAI.01021-09.
- VAN DEN BRUELE, T.; MOURAD-BAARS, P.E., CLAAS, VAN DER PLAS, R.N.; KUJIPER, BREDIUS, R.G. *Campylobacter jejuni* bacteremia and *Helicobacter pylori* in a patient with X-linked agammaglobulinemia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 29, n. 11, p. 1315-1319, 2010.
- VAN DOORN, P.A.; RUTS, L.; JACOBS, B.C. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. **Lancet Neurol.**, v. 7, p. 939-950, 2008.
- VAN PUTTEN, J.P.; VAN ALPHEN, L.B.; WÖSTEN, M.M.; ZOETE, M.R. Molecular mechanisms of *Campylobacter* infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 337, p. 197-229, 2009. doi: 10.1007/978-3-642-01846-6\_7.
- VANCE, R.E.; ISBERG, R.R.; PORTNOY, D.A. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. **Cell Host Microbe.**, v. 6, n. 1, p. 10-21, 2009.
- VEGOSEN, L.; DAVIS, M.F.; SILBERGELD, E.; BREYSSE, P.N.; AGNEW, J.; GRAY, G.; FREEMAN, L.B.; KAMEL, F. Neurologic symptoms associated with cattle farming in the agricultural health study. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 54, n. 10, p. 1253-1258, 2012.

VERDU, E.F.; MAURO, M.; BOURGEOIS, J.; ARMSTRONG, D. Clinical onset of celiac disease after an episode of *Campylobacter jejuni* enteritis. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 21, n. 7, p. 453-455, 2007.

VÉRON, M.; CHATELAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the serotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 23, n. 2, p. 122-134, 1973.

VICTORA, C.G.; BRYCE, J.; FONTAINE, O.; MONASCH, R. Reducing deaths from diarrhoea through oral rehydration therapy. **Bull. World Health Organ.**, v. 78, n.10, p.1246-1255, 2000.

VOS, T.; FLAXMAN, A.D.; NAGHAVI, M.; LOZANO, R.; MICHAUD, C.; EZZATI M. *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, p. 2163–2196, 2012.

WACKER, M.; LINTON, D.; HITCHEN, P.G.; NITA-LAZAR, M.; HASLAM, S.M.; NORTH, S.J.; *et al.* N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. **Science**, v. 298, n. 5599, p. 1790-1793, 2002.

WAKERLEY, B.R.; YUKI, N. Infectious and noninfectious triggers in Guillain-Barré Syndrome. **Expert Rev. Clin. Immunol.**, v. 9, n. 7, p. 627-639, 2013.

WALLACE, P.S.; MACKAY, W.G. Quality in the molecular microbiology laboratory. **Methods Mol. Biol.**, v. 943, p. 49-79, 2013.

WALKER, R.I. *Campylobacter* vaccine development: a key to controlling enteric diseases. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.

WALKER, S.P.; WACHS, T. D.; GARDNER, J. M.; LOZOFF, B.; WASSERMAN, G. A.; POLITT, E.; CARTER, J. A. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. **Lancet**, v. 369, n. 9556, p. 145-157, 2007.

WANG, G.; CLARK, C.G.; RODGERS, F.G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and the components of the type 2 Shiga toxin family by Multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3613-3619, 2002. doi: 10.1128/JCM.40.10.3613-1619.2002

WASSENAAR, T.M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 466–476, 1997.

WASSENAAR, T.M. Following an imaginary *Campylobacter* population from farm to fork and beyond: a bacterial perspective. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 53, n.3, p. 253-263, 2011. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03121.x

WATSON, R.O.; GALÁN, J.E. Signal transduction on *Campylobacter jejuni*-induced cytokine production. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 5, p. 655-665, 2005.

WATSON, R.O.; GALÁN, J.E. *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 1, e14, 2008.

WILSON, G.; BADARUDEEN, S.; GODWIN, A. Antibiotic screening of urine culture as a useful quality audit. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 26, n. 4, p. 299-302, 2011.

WIMALARATHNA, H.M.; RIACHARDSON, J.F.; LAWSON, A.J.; ELSON, R.; MELDRUM, R.; LITTLE, C.L *et al.* Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. **BMC Microbiol.**, v. 13, p. 160, 2013.

WINE, E.; CHAN, V.L.; SHERMAN, P.M. *Campylobacter jejuni* mediated disruption of polarized epithelial monolayers is cell-type specific, time dependent, and correlates with bacterial invasion. **Pediatr. Res.**, v. 64, n. 4, p. 599-604, 2008.

WISE, M.E.; VIRAY, M.; SEJVAR, J.J.; LEWIS, P.; BAUGHMAN, A.L.; CONNOR, W.; *et al.* Guillain-Barre syndrome during the 2009-2010 H1N1 influenza vaccination campaign: population-based surveillance among 45 million Americans. **Am. J. Epidemiol.**, v. 175, n. 11, p. 1110-1119, 2012.

WOLK, K.; WITTE, E.; WITTE, K.; WARSZAWSKA, K.; SABAT, R. Biology of interleukin-22. **Semin. Immunopathol.**, v. 32, n. 1, p. 17-31, 2010.

WOOD, C.J.; FLEMING, V.; TURNIDGE, J.; THOMSON, N.; ATKINS, R.C. *Campylobacter* peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: report of eight cases and review of the literature. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 19, n. 3, p. 257-263, 1992.

WYRSCH, M.; COAKLEY, K.; ALEXANDER, N.; SALEU, G.; TALME, J.; KAKAZO, M.; *et al.* Diarrhoea morbidity in children in the Asaro Valley, Eastern Highlands Province, Papua New Guinea. **P. N. G. Med. J.**, v. 41, n. 1, p. 7-14, 1998.

WYSOK, B.; URADZINSKI, J. *Campylobacter* spp. – a significant microbiological hazard in food. II. Lesions and infection development, pathogenic mechanisms and complications. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 12, n. 2, p. 285-291, 2009.

YILGWAN, C.S.; OKOLO, S.N. Prevalence of diarrhea and risk factors in Jos University Teaching Hospital, Nigeria. **Ann. Afr. Med.**, v. 11, n. 4, p. 217-221, 2012.

YOTHER, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. **Ann. Rev. Microbiol.** v. 65, p. 563-581, 2011.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 9, p. 665-679, 2007.

YOUNG, V. B.; SCHAUER, D. B. Cytolethal distending toxin: a bacterial toxin which disrupts the eukaryotic cell cycle. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, p. 936-939, 2000.

YUKI, N.; HARTUNG, H.P. Guillain-Barré syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 366, n. 24, p. 2294-2304, 2012.

ZAUTNER, A.E.; OHK, C.; TAREEN, A.M.; GROB, U. Epidemiological association of *Campylobacter jejuni* groups with pathogenicity-associated genetic markers. **BMC Microbiol.**, v. 12, p. 71, 2012. doi: 10.1186/1471-2180-12-171.

ZHANG, M.; LI, Q.; HE, L.; MENG, F.; GU, Y.; ZHENG, M. *et al.* Association study between an outbreak of Guillain-Barre syndrome in Jilin, China, and preceding *Campylobacter jejuni* infection. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 7, n. 8, p. 913-919, 2010. doi: 10.1089/fpd.2009.0493.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; BOUGHAN, P.K.; HARRIS, A.; WREN, B.W.; KLEIN, N.J.; BAJAJ-ELLIOTT, M. Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 11, p. 7281-7289, 2005.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; ELM, A.; LINDLEY, K.J.; SCHÜLLER, S.; JONES, H.E.; *et al.* A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. **Cell Microbiol.**, v. 9, n. 10, p. 2404-2416, 2007.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B. W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 2, p. 123-129, 2008.


ZIPRIN, R. L.; YOUNG, C. R.; BYRD, J. A.; STANKER, L. H.; HUME, M. E.; GRAY, S. A. *et al.* Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. **Avian Dis.**, 45, p. 549-557, 2001.



**ANEXO B - CEP (HIAS)****HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HIAS**

O protocolo "Avaliação de um teste prático para diagnóstico etiológico das diarreias (DEC) em uma unidade hospitalar de Fortaleza, Brasil", versão 3.0, tradução do protocolo em inglês "Brazil DEC evaluation protocol v.3.0" foi recebido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin (CEP-HIAS), e foi considerado conforme o projeto DEC anteriormente submetido e já aprovado por este Comitê (Registro CONEP 13526). O CEP-HIAS considera assim o protocolo acima aprovado para sua implementação.

Fortaleza, 22 de janeiro de 2008.

  
Regina L. Ribeiro Moreno

Coordenadora do CEP-HIAS

Coordª do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital Infantil Albert Sabin



## ANEXO C - TCLE

*Protocolo de Avaliação do DEC - Brasil, versão em português 5.0 de 25.08.2008*  
*Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ e HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN, Fortaleza, CE, BRASIL**

**e**  
**PATH, Seattle WA, EUA**

**TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação de um Cartão para Diagnóstico Entérico para Manejo de Diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil**

### TERMO DE CONSENTIMENTO PARA OS PAIS

#### PESQUISADORES:

Aldo Lima Ph.D.	Universidade Federal do Ceará. (Fone: 55-85-3366-8437)
Richard Guerrant M.D., Ph.D.	Universidade da Virgínia, Virgínia, EUA
Matthew Steele Ph.D., M.P.H.	PATH, Seattle, Washington, EUA
Bernhard Weigl Ph.D.	PATH, Seattle, Washington, EUA

#### INTRODUÇÃO

Convidamos você a permitir que seu (a) filho (a) possa participar de uma pesquisa médica. A participação dela é voluntária. Este formulário dá um resumo da informação que os pesquisadores discutirão com você. Se sua criança participar deste trabalho de pesquisa, você ficará com uma cópia deste formulário. Certifique-se de ter feito todas as perguntas que você tenha sobre esta pesquisa.

Seu filho poderá participar deste estudo porque ele está com diarreia.

#### PORQUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Este estudo está sendo feito para desenvolver um teste que ajude os médicos a conhecer a causa da diarreia. Se o novo teste funcionar, ele dirá aos médicos o que está causando a diarreia em menos de meia hora. Hoje, leva de 3 a 5 dias para saber o que causa a diarreia na criança.

Nós estamos coletando amostras de fezes das crianças da Emergência com diarreia. Gostaríamos de coletar uma pequena amostra de fezes de seu filho. Estamos planejando coletar amostras de fezes de mais de 1000 crianças que vêm a este Hospital.

Os pesquisadores e médicos do hospital estão trabalhando com pesquisadores dos Estados Unidos (EUA). Os pesquisadores americanos são do PATH, uma organização sem fins lucrativos de Seattle, estado de Washington, e a Universidade de Virgínia.

#### QUEM ESTÁ PARTICIPANDO DO ESTUDO?

Se você permitir deixar seu filho participar, um profissional vai examinar seu filho, fará perguntas sobre a saúde dele e sobre a diarreia. Você será interrogado sobre trabalho e tempo de estudo. O exame é uma parte de rotina no atendimento de seu filho mas as perguntas que faremos em geral não são feitas pelo médico. Se seu filho preencher os critérios de inclusão, uma amostra de fezes dele será coletada.

A pequena amostra de fezes será coletada da fralda de seu filho (se ele for menor de dois anos). Para as crianças maiores, a amostra será coletada com um recipiente. Se a criança não puder nos dar uma amostra de fezes dessa maneira, coletaremos uma pequena amostra com um swab retal. Poderemos lhe pedir de coletar uma amostra em casa e trazer para o hospital.

Utilizaremos a amostra de fezes para fazer os exames padrões para saber o que está causando a diarreia na sua criança. Uma parte da amostra será utilizada para o novo teste. Como nós não sabemos se o novo teste é correto, os resultados não podem ainda ser usados para os cuidados do seu filho ou para o tratamento.

Com sua permissão, alguma quantidade da amostra será congelada e encaminhada para PATH nos Estados Unidos. A amostra será utilizada para confirmar o estudo em testes futuros e não poderá retornar uma vez que for despachada. As amostras enviadas aos Estados Unidos não terão nomes ou outra informação que possa identificar seu filho.

#### QUAIS SÃO OS RISCOS DE PARTICIPAR DESTA PESQUISA?

Não há riscos conhecidos para sua criança participar deste estudo. A coleta de amostra de fezes de seu filho em um recipiente ou da fralda não causa qualquer dano. A coleta de amostra por um swab colocado no reto pode causar um desconforto passageiro. A coleta de amostra retal é uma prática rotineira em crianças com diarreia grave na Emergência para fazer exames de diagnóstico. Não é uma prática de rotina em crianças com diarreia leve.

#### EXISTEM BENEFÍCIOS PARA PARTICIPAR NESTA PESQUISA?

Participando este estudo, seu filho receberá o tratamento normal dos pacientes com diarreia na Emergência. Também testaremos as fezes para compreender o que está causando a diarreia. Este teste geralmente não é feito nas diarreias comuns. A informação será utilizada para ajudar no tratamento da sua criança se seu filho tiver um caso grave de diarreia que necessite ficar hospitalizado no Albert Sabin.

**Regina Lúcia R. Moreno**  
 Coord. Comitê de Ética em Pesquisa  
 Hospital Infantil Albert Sabin

*Protocolo de Avaliação do DEC – Brasil, versão em português 5.0 de 25.08.2008*  
*Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil*

O que nós vamos aprender com este estudo pode ajudar a desenvolver um novo teste para saber rapidamente a causa da diarreia. Isto vai ajudar as crianças com diarreia no futuro.

#### COMO FICA A CONFIDENCIALIDADE?

A informação que nós coletarmos e as amostras de fezes serão etiquetadas com um número da pesquisa. Nenhum nome será utilizado para os questionários ou as amostras de fezes. Somente os pesquisadores brasileiros saberão qual o código que vincula o nome da criança ao questionário da pesquisa e amostra de fezes. Os pesquisadores dos Estados Unidos não terão o vínculo de acesso ao nome da criança.

Os dados da pesquisa serão mantidos durante 5 anos depois do fim do estudo. O vínculo entre o número do estudo e o prontuário clínico da criança será destruído quando os resultados do laboratório forem colocados no prontuário. As amostras de fezes da pesquisa enviadas aos Estados Unidos serão mantidas oito anos e utilizadas em pesquisas futuras sobre diarreia.

Nenhum nome será utilizado em publicações ou apresentação dos resultados da pesquisa.

#### MEU/MINHA FILHO(A) OU EU SEREMOS PAGOS PARA PARTICIPAR DO ESTUDO?

Não há pagamento para você ou seu/sua filho(a) para participar do estudo.

#### QUAIS SÃO OS DIREITOS DO MEU/MINHA FILHO(A) COMO PARTICIPANTE DA PESQUISA?

Participar da pesquisa é um gesto voluntário. Você pode decidir não querer que seu/sua filho(a) participe do estudo. Você pode mudar de opinião em qualquer momento e se retirar do estudo. Sua decisão de sair do estudo não vai afetar o atendimento médico do seu filho no Hospital Infantil Albert Sabin de modo algum.

#### A QUEM DEVO CHAMAR SE TIVER PERGUNTAS OU PROBLEMAS?

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo por favor ligue para o Dr. Aldo Lima, telefone 33668445 na Universidade Federal do Ceará.

Se você tiver dúvidas sobre os direitos de seu filho como participante da pesquisa, por favor chame Dr. Regina Lúcia Moreno, da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin. Dra. Regina Lúcia pode ser encontrada no telefone local 31014193.

#### PERGUNTAS PARA CONFIRMAÇÃO DA COMPREENSÃO DO PROTOCOLO DA PESQUISA

Antes de assinar este termo de consentimento, o pesquisador lhe fará uma série de perguntas para ter certeza de que você entendeu a pesquisa e os direitos de seu/sua filho(a).

- |  |           |
|--|-----------|
| 1. Vai haver coleta de uma amostra de fezes neste estudo?  | SIM / NÃO |
| 2. Seu/sua filho(a) receberá atendimento e tratamento da diarreia se você não quiser participar da pesquisa? | SIM / NÃO |
| 3. Existe alguma penalidade para seu/sua filho(a) se você disser NÃO para participar da pesquisa?            | SIM / NÃO |
| 4. Seu/sua filho(a) será pago para participar da pesquisa?   | SIM / NÃO |
| 5. Amostras de fezes serão enviadas aos Estados Unidos para continuar com os estudos sobre diarreia?         | SIM / NÃO |

#### DECLARAÇÃO DOS PAIS

A pesquisa foi bem explicada para mim. Eu tive oportunidade de fazer perguntas. Eu sei a quem ligar para qualquer dúvida futura que eu possa ter. Eu concordo que meu filho participe da pesquisa. Uma cópia deste termo de consentimento me foi dada.

#### ASSINATURA DOS PAIS

Se você concorda em permitir que seu filho tome parte na pesquisa, por favor assine este formulário. Por favor, marque abaixo se aceita fazer doação de uma amostra de fezes para pesquisa posterior.

- Sim, amostra restante de fezes podem ser enviadas ao PATH nos Estados Unidos. A amostra será codificada e os pesquisadores do PATH não terão acesso ao nome da criança. Eu entendo que as amostras ficarão armazenadas durante 8 anos para confirmar a pesquisa diagnóstica.
- Não, o restante das amostras de fezes de meu filho não serão enviadas aos Estados Unidos para pesquisas futuras sobre diarreia.

Impressão do polegar do  
parente (se necessário)



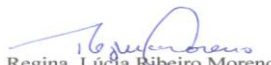
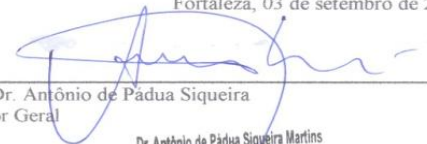
Nome do Pai ou Responsável Legal

Assinatura do Pai ou Responsável Legal





## ANEXO D - CEP (CAC)

 <p>Hospital Infantil <b>Albert Sabin</b> Secretaria de Saúde do Ceará</p>	<p><b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União Fortaleza – Ceará Fone/Fax: (85) 3101.4212 – 3101.4283 E-mail: cep@hias.ce.gov.br</p>	 <p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN</p>	<p>Secretaria Municipal de Saúde Hospital Nossa Senhora da Conceição Conjunto Ceará – IV Etapa Regional VI Fortaleza – CE</p>
<p><b>Referência:</b> Protocolo CEP-HIAS Nº 80/06</p>			
<p><b>Título:</b> Avaliação de um Cartão de Diagnóstico Entérico para o Manejo de Diarréia em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil, versão 5.0.</p>			
<p><b>Coordenadores locais do estudo:</b> Dr. Aldo A. M. Lima Dr. Luis Carlos Rey</p>			
<p>Levamos ao conhecimento dos responsáveis pelo projeto “Avaliação de um Cartão de Diagnóstico Entérico para o Manejo de Diarréia em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil”, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin (CEP-HIAS), analisou e aprovou a emenda ao protocolo versão 4.0, onde se prevê que o Centro de Assistência à Criança Dra. Lúcia de Fátima R. G. Sá torne-se um novo local de recrutamento de crianças com diarréia e coleta de amostras de fezes para o estudo. Esta emenda, agora aprovada, transforma a versão 4.0, datada de 25 de agosto de 2008, na nova versão 5.0 do mesmo protocolo.</p>			<p>À Comissão de Ética em Pesquisas do Hospital Infantil Albert Sabin,</p>
<p>Fortaleza, 30 de outubro de 2008.</p>			<p>Eu abaixo assinado, Diretora Clínica do Hospital Distrital N. Senhora da Conceição, estou ciente da pesquisa intitulada “<b>Avaliação de um Cartão para Diagnóstico Entérico para Manejo de Diarréia (Dec) em Unidades Hospitalares de Fortaleza, Brasil</b>”, e aprovo sua realização nesta Unidade Hospitalar, desde que dentro das Normas Exigidas pela Comissão de Ética do HIAS.</p>
<p> Regina Lúcia Ribeiro Moreno Coordenadora do CEP-HIAS</p> <p><b>Regina Lúcia R. Moreno</b> Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Infantil Albert Sabin</p>			<p>Fortaleza, 03 de setembro de 2008.</p> <p> Dra. Dr. Antônio de Pádua Siqueira Diretor Geral</p> <p>Dr. Antônio de Pádua Siqueira Martins CREMEC: 4916-CPF 355.365.783-91 Diretor Executivo do H.N.S.C.</p>

## ANEXO E – Checklist de Elegibilidade



HIAS-UFC

*Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC)  
em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil*

### Checklist de Elegibilidade Para o Recrutamento de Participantes

**1. O paciente não apresentou 3 ou mais fezes líquidas nas últimas 24 horas?**

**SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO**

SIM \_\_\_ NÃO \_\_\_

**2. A criança é amamentada exclusivamente ao seio?**

**SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO**

SIM \_\_\_ NÃO \_\_\_

**3. A criança tomou antibiótico nos últimos 30 dias?**

**SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO**

SIM \_\_\_ NÃO \_\_\_

**4. A criança estava internada por 12 h ou mais antes de vir ao HIAS?**

**SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO**

SIM \_\_\_ NÃO \_\_\_

**5. A criança já participou deste mesmo estudo antes?**

**SE SIM, NÃO INCLUIR NO ESTUDO**

SIM \_\_\_ NÃO \_\_\_

## ANEXO F - Questionário (Dados clínicos)



HIAS-UFC  
*Avaliação de um cartão para diagnóstico entérico para manejo de diarreia (DEC)  
 em uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil*

### Formulário de Avaliação Clínica (CRF)



1. Data de aplicação do questionário \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
2. Seu filho é menino (1) ou menina (2)? Sexo \_\_\_\_
3. Qual o dia do aniversário de seu filho? Data de nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
4. Qual a idade de seu filho(a) \_\_\_\_ anos \_\_\_\_ meses
5. Quantas pessoas moram na casa da criança (inclusive)? \_\_\_\_ pessoas
6. Quantos cômodos tem a casa onde mora a criança? \_\_\_\_\_
7. Quantos cômodos a casa tem para dormir? \_\_\_\_\_
8. Quantas pessoas fumam na casa? \_\_\_\_\_
9. Você prepara o alimento da criança? Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
10. Você lava as mãos antes de preparar o alimento da criança? Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
11. A casa tem água da Cagece? Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
12. A água de beber da casa é proveniente de : \_\_\_\_\_  
 1= CAGECE, 2= poço profundo, 3= cacimba, 4= carroça, 5= lagoa/riacho/rio, 6=  
 outras fontes \_\_\_\_\_
13. Se não possui água encanada, o que você faz antes de cozinhar ou beber a água: \_\_\_\_  
 1= ferve 2= usa filtro 3= usa solução de cloro 4= outro \_\_\_\_\_
14. A casa tem sanitário com descarga? Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
15. O sanitário fica dentro da casa? Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
16. Existe água corrente e sabão para lavar as mãos perto do sanitário Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
17. O sanitário está ligado na rede de esgoto da cidade? Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
18. Crianças menores de 5 anos defecam no chão da casa/quintal? \_\_\_\_\_  
 (1= sempre, 2= frequentemente, 3= poucas vezes, 4= não ou raramente, 9=  
 NS)
19. Animais costumam ficar dentro da casa? Sim \_\_\_\_ Não \_\_\_\_
20. Se sim, que animais ficam dentro de casa \_\_\_\_\_

1= cão, 2= gato, 3= galinha, 4=outro \_\_\_\_\_

21. Quantos anos de estudos a mãe da criança completou? \_\_\_série \_\_\_grau, \_\_\_anos  
(99= NS)
22. Quantos anos de educação escolar o pai completou? \_\_\_série \_\_\_grau, \_\_\_anos
23. No último mês, qual foi a renda total da família? \_\_\_ \_\_ \_\_ \_\_ reais/mês NS \_\_\_
24. Quantas vezes seu filho(a) evacuou ontem? \_\_\_\_\_ /dia
25. Há quanto tempo seu filho(a) está com diarreia? \_\_\_ dias \_\_\_ meses \_\_\_ NS
26. Teve sangue vivo nas fezes de seu filho durante algum episódio de diarreia? \_\_\_ Não  
\_\_\_ Somente raios de sangue  
\_\_\_ Sim  
\_\_\_ Sim, alguém viu sangue  
\_\_\_ Não sabe
27. Seu filho teve dor de barriga forte desde o início da doença?  
\_\_\_ Sim, mas não foi a causa da consulta  
\_\_\_ Sim, a dor é muito forte (choro constante, flexão do tronco)  
\_\_\_ Não  
\_\_\_ NS
28. A criança vomitou desde o início da doença? \_\_\_ Sim \_\_\_ Não \_\_\_ NS
29. Quantos dias a criança teve vômitos nesta doença? \_\_\_\_\_ dias
30. Seu filho teve febre durante esta doença? \_\_\_ Sim \_\_\_ Não \_\_\_ NS
31. Se sim, qual a mais alta temperatura que ele teve? \_\_\_ \_\_, \_\_\_ graus C  
\_\_\_ Não foi medida

Entrevistador \_\_\_\_\_ Data da entrevista \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

## ANEXO G - III Congresso Brasileiro de Biotecnologia



**CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA**  
SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOTECNOLOGIA  
Fortaleza-CE - 12 a 15 de outubro de 2010  
Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

**CERTIFICADO**

A Comissão Científica do 3º. Congresso Brasileiro de Biotecnologia declara que o trabalho intitulado "DNA extraction directly from children stool samples: Comparison between frozen material and fecal swabs for enteric pathogens detection," autoria de JOSIANE QUETZ foi apresentado no 3º. Congresso Brasileiro de Biotecnologia, realizado no período de 12 a 15 de Outubro de 2010, em Fortaleza-CE.



Maria Fatima Grossi de Sá  
Presidente do Conselho



SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOTECNOLOGIA



Maria Sueli Soares Felpe  
Presidente do Conselho


**DNA extraction directly from children stool samples: Comparison between frozen material and fecal swabs for enteric pathogens detection.**

Josiane S Quetz<sup>1</sup>, Ila FN Lima<sup>1</sup>, Alexandre Havt<sup>1</sup>, Mara MG Prata<sup>1</sup>, Pedro HQS Medeiros<sup>1</sup>, David AC Cid<sup>1</sup>, Luís C Rey<sup>1</sup>, Bernhardt Weigl<sup>2</sup>, Aldo AM Lima<sup>1</sup>.<sup>1</sup>Institute of Biomedicine for Brazilian Semi-Arid (IBISAB) & Clinical Research Unit / Center for Global Health, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil; <sup>2</sup>Program for Appropriate Technology in Health (PATH), Seattle, USA.

**Background and Aims:** The ideal method for pathogen DNA (pDNA) extraction from fecal samples should recover high quantities of pure, integral pDNA with minimal co-extraction of inhibitors. Also, cost and speed of extraction should be taken into account. In our routine enteric pathogens detection, we use DNA extraction directly from frozen stool samples (FSS) using *QIAamp DNA stool Mini kit* (QIAGEN, USA) with excellent results. However, the extraction of swab-type fecal samples (swabs) was not described by instructor's guide - a limitation for certain studies. In this report we evaluate the quantity and quality of DNA extracted from FSS and swabs. **Methods:** From May 2008 to April 2009, it was realized stool samples collection from 432 children with diarrhea assisted in emergency rooms in Fortaleza, Brazil. After parental consent and collection, specimens were stored at -80°C. We used 314 FSS (200mg or 200µL) and 69 swabs to carry the DNA extractions out. For the FSS extractions, the regular instructions were obeyed, and for the swabs extraction, an initial wash step was included and the elution was performed with half the usual volume. All samples were quantified for DNA concentration using a spectrophotometer (Eppendorf BioPhotometer Plus, Germany). The purity of pDNA extracted was determined by measuring the 260–280nm absorbance ratio ( $A_{260}/A_{280}$ ). We also performed an internal control PCR detection in all pDNA extracted from swabs (*rrs*, encoding *E. coli*'s 16S rRNA). **Results:** The mean concentration obtained were: 55.7 µg/mL ± 68.7 SD, for FSS extracted pDNA; and 32.9 µg/mL ± 32.0 SD for swabs extracted pDNA. The mean of  $A_{260}/A_{280}$  ratios was 1.72 for both FSS and *swabs* extracted pDNA. According to the spectrophotometric analysis, FSS extracted pDNA were quite similar to *swabs* extracted pDNA (*Student's T test*,  $p>0.05$ ). The percentage of the positive internal amplification control in the pDNA extracted from swabs was 100% (69/69). **Conclusion:** The combination of spectrophotometric readings and amplification of internal control reflects the utility of the extracted sample for end-point usage. Our data showed that the DNA extracted from FSS and swabs were not significant different and both showed enough quantity and appropriate quality for enteric pathogens molecular detection. **Financial support:** CNPq / PATH (USA).



## ANEXO H - SOPs Microbiologia (DEC)

	<p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ</b>          Unidade de Pesquisas Clínicas &amp; Instituto de Biomedicina          Projeto: Avaliação de um Cartão para Diagnóstico Entérico para Manejo de Diarréia (DEC) em          uma Unidade Hospitalar de Fortaleza, Brasil          Rua Cel. Nunes de Melo , 1315 - CEP: 60.430-270 - C.P 3229 – Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, Brasil          Fone: (55) 85. 3366.8437 – Fax: (55) 85. 3366.8445 – e-mail: <a href="mailto:ibimed@veloxmail.com.br">ibimed@veloxmail.com.br</a></p>
<p><b>PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE FEZES</b></p> <p><b>Objetivo</b>          Este protocolo descreve os procedimentos para o processamento de amostras fecais no laboratório.</p> <p><b>Materiais</b>          Swabs Micronic;          Swabs estéreis;          Tubos contendo tampão de lise;          Tubos com capacidade para 2mL;          Tesoura;          Placas e caldos de cultura;          Capela de exaustão de gases;          Freezer abaixo de -70°C.</p> <p><b>Amostras</b>          Fezes frescas obtidas em copos de coleta durante o período da manhã, estocadas na geladeira (2-8°C) e transportadas para o laboratório em gelo no início da tarde do mesmo dia.</p> <p><b>Métodos</b>          Usar quatro swabs Micronics, dois swabs estéreis, dois tubos contendo aproximadamente 700µL de tampão de lise e cinco tubos de 2mL para o processamento das amostras fecais coletadas. Identificar os tubos com as seguintes etiquetas, usando o sistema de código de barras: tampão, swab e fezes congeladas.</p> <p>Aliquotar as fezes utilizando os dois primeiros swabs Micronics e inseri-los em cada um dos dois tubos com tampão de lise, misturar cerca de 12 vezes para dispensar as fezes no meio e descartar os swabs.</p> <p>Aliquotar as fezes com os outros dois swabs Micronics, colocá-los em cada um dos dois tubos vazios de 2mL e cortar os cabos dos swabs com a tesoura.          Usar um swab estéril para inocular as placas de cultura e o caldo selenito. Inocular o outro swab estéril contendo fezes em tubo contendo 700µL de caldo MacConkey, incubar de 18 a 24 horas a 37°C, adicionar 15% de glicerol e congelar abaixo de -70°C (MOP – Cultura de Fezes).</p> <p>Preencher três tubos vazios de 2mL com fezes para pesquisas futuras com o Cartão de Diagnóstico Entérico ou outros diagnósticos.          Aliquotar o material restante para a realização de testes adicionais no Brasil (lactoferrina e outros). Armazenar todos os tubos abaixo de -70°C. Enviar os lisados, os dois tubos contendo swabs Micronics, o caldo MacConkey e os três tubos extras com fezes para o PATH, Seattle em gelo seco.</p> <p><b>Controle de Qualidade</b>          Não aplicável.</p> <p><b>Resultados</b>          Não aplicável.</p> <p><b>Referências</b>          Protocolo de “Evaluation of a Diagnostic Enteric Card for Management Diarrhea in a Clinical Site in Fortaleza, Brazil”.</p>	

## CULTURA DE FEZES

### Objetivo

Este protocolo descreve os procedimentos para a identificação de espécies bacterianas específicas (*Escherichia coli* O157, *Salmonella*, *Shigella* and *Campylobacter jejuni*) a partir de cultura microbiológica de amostras fecais.

### Materiais

Equipamentos e Materiais de Consumo

Caneta marcadora;

Swabs estéreis;

Alças de inoculação bacteriológica;

Sistema gerador de microaerofilia e jarra incubadora;

Lâminas para microscopia;

Papel de filtro;

Pipetas Pasteur;

Microscópio óptico;

Estufas a 37°C e 42°C;

Binco de Bunsen;

Freezer abaixo de -70°C.

Meios e Reagentes

Placas de ágar MacConkey (MAC);

Placas de ágar Sorbitol MacConkey (SMAC);

Placas de ágar Entérico de Hektoen (HE);

Placas de ágar *Salmonella Shigella* agar plate (SS);

Placas de ágar *Campylobacter* (Campy);

Caldo Selenito;

Caldo MacConkey (MAC broth);

Glicerol;

Tiras do sistema API 20E;

Reagents do API;

Teste de aglutinação em látex para *E. coli* O157;

Reagente da oxidase;

Reagents para coloração de Gram.

### Amostras

Fezes frescas obtidas em copos de coleta durante o período da manhã, estocadas na geladeira (2-8°C) e transportadas para o laboratório em gelo no início da tarde do mesmo dia.

### Métodos

Dia 1 (dia de recebimento da amostra):

As amostras devem ser processadas e aliqüotadas de acordo com as instruções descritas no MOP – Processamento de Amostras de Fezes.

Reservar, para cada amostra, uma placa de MAC, SMAC, HE, SS e Campy e um tubo contendo caldo selenito e caldo MAC. Removê-los da geladeira e esperar que atinjam a temperatura ambiente.

Identificar as placas e os tubos com as seguintes etiquetas, usando o sistema de código de barras: MAC, SMAC, HE, SS, Campy, Selenito e MAC caldo.

Tocar as fezes com um swab estéril e tocá-lo próximo a uma das bordas dos meios de cultura, na seguinte ordem: MAC, SMAC, HE, SS e Campy. Em seguida, inocular o swab no caldo selenito.

Tocar as fezes com um Segundo swab estéril e inoculá-lo no caldo MAC. Estriar cada placa empregando técnica de isolamento.

Incubar os caldos e as placas invertidas em atmosfera aeróbia, a 37°C±2°C, por 18 a 24 horas, exceto a placa de Campy, que deve ser incubada a 42°C±1°C, por 48 horas em atmosfera microaerófila.

Dia 2 (24 horas após o recebimento da amostra):

Examinar a presença de crescimento nas placas, com exceção do meio para Campy.

**MAC** – observar somente se há crescimento para garantir a viabilidade da amostra. Considerar colônias não-

fermentadoras de lactose (claras, transparentes) somente quando esta colônia não crescer em outro meio de cultura (SMAC, HE and SS). Neste caso, se a colônia estiver isolada e se houver crescimento suficiente, testá-la para a atividade da oxidase, de acordo com as instruções no MOP – **Teste de Oxidase**. Se o resultado for negativo, inocular as colônias em tiras do sistema API 20E e incubá-las a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante (POP – API 20E). Se a colônia não-fermentadora de lactose não estiver isolada e/ou se não houver crescimento suficiente desse tipo de colônia, tocá-la com uma alça de inoculação e plaqueá-la em uma placa de MAC. Estriar e incubar em atmosfera aeróbia, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas, para obter material suficiente e de qualidade (colônias isoladas) para continuar os testes. Se nenhum crescimento for observado nessa placa, reincubá-la.

**SMAC** – observar colônias não-fermentadoras de sorbitol (claras, transparentes). Se ela estiver isolada e se houver crescimento suficiente, testá-la para a atividade da oxidase, de acordo com as instruções no MOP – Teste de Oxidase. Se o resultado for negativo, inocular as colônias em tiras do sistema API 20E e incubá-las a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante (POP – API 20E). Se a colônia não-fermentadora de sorbitol não estiver isolada e/ou se não houver crescimento suficiente desse tipo de colônia, tocá-la com uma alça de inoculação e plaqueá-la em uma placa de MAC. Estriar e incubar em atmosfera aeróbia, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas, para obter material suficiente e de qualidade (colônias isoladas) para continuar os testes. Se nenhum crescimento for observado nessa placa, reincubá-la.

**HE** – observar colônias não-fermentadoras de lactose (claras, transparentes, revelando o fundo verde, cor característica do meio) ou colônias produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$  (claras com o centro negro ou colônias enegrecidas). Se ela estiver isolada e se houver crescimento suficiente, testá-la para a atividade da oxidase, de acordo com as instruções no MOP – Teste de Oxidase. Se o resultado for negativo, inocular as colônias em tiras do sistema API 20E e incubá-las a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante (POP – API 20E). Se a colônia de interesse não estiver isolada e/ou se não houver crescimento suficiente desse tipo de colônia, tocá-la com uma alça de inoculação e plaqueá-la em uma placa de MAC. Estriar e incubar em atmosfera aeróbia, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas, para obter material suficiente e de qualidade (colônias isoladas) para continuar os testes. Se não for observado crescimento de colônias não-fermentadoras de lactose ou colônias produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$ , plaquear uma nova placa de HE a partir do caldo Selenito inoculado no dia anterior. Incubar as duas placas de HE (inicial e subcultura) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas. Se nenhum crescimento for observado na placa inicial, reincubá-la.

**SS** – observar colônias não-fermentadoras de lactose (claras, transparentes, revelando o fundo rosa, cor característica do meio) ou colônias produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$  (claras com o centro negro ou colônias enegrecidas). Se ela estiver isolada e se houver crescimento suficiente, testá-la para a atividade da oxidase, de acordo com as instruções no MOP – Teste de Oxidase. Se o resultado for negativo, inocular as colônias em tiras do sistema API 20E e incubá-las a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante (POP – API 20E). Se a colônia de interesse não estiver isolada e/ou se não houver crescimento suficiente desse tipo de colônia, tocá-la com uma alça de inoculação e plaqueá-la em uma placa de MAC. Estriar e incubar em atmosfera aeróbia, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas, para obter material suficiente e de qualidade (colônias isoladas) para continuar os testes. Se não for observado crescimento de colônias não-fermentadoras de lactose ou colônias produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$ , plaquear uma nova placa de SS a partir do caldo Selenito inoculado no dia anterior. Incubar as duas placas de SS (inicial e subcultura) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas. Se nenhum crescimento for observado na placa inicial, reincubá-la.

**MAC caldo** – adicionar 0,15mL (15%) de glicerol e armazenar abaixo de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Dia 3 (48 horas após o recebimento da amostra):

Se nenhum crescimento foi observado no dia 2, examinar as placas utilizando os mesmos critérios e procedimentos descritos acima (com exceção do meio para Campy).

**MAC** – se nenhum crescimento for observado no dia 3, a amostra é considerada inviável.

**SMAC** – se a presença de colônias não-fermentadoras de sorbitol não for observada no dia 3, a amostra é considerada negativa para *E. coli* O157. Se aplicável, ler as tiras de API20E inoculadas no dia 2. Se o resultado for positivo para *E. coli*, testar a colônia através do Teste de Látex para *E. coli* O157, de acordo com as instruções do fabricante (POP – Teste de Látex para *E. coli* O157). Se aplicável, testar as colônias

isoladas em MAC no dia 2 quanto à atividade da oxidase. Se o resultado for negativo, inocular as colônias em tiras do sistema API 20E e incubá-las a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante (POP – API 20E).

**HE** – se no dia 3 não for observada a presença de colônias não-fermentadoras de lactose ou colônias produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$  na placa de HE inicial nem na placa de HE subcultivada, a amostra é considerada negativa para *Salmonella* e *Shigella*. Se aplicável, ler as tiras de API20E inoculadas no dia 2. Se aplicável, testar as colônias isoladas em MAC no dia 2 quanto à atividade da oxidase. Se o resultado for negativo, inocular as colônias em tiras do sistema API 20E e incubá-las a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante (POP – API 20E).

**SS agar** – se no dia 3 não for observada a presença de colônias não-fermentadoras de lactose ou colônias produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$  na placa de SS inicial nem na placa de SS subcultivada, a amostra é considerada negativa para *Salmonella* e *Shigella*. Se aplicável, ler as tiras de API20E inoculadas no dia 2. Se aplicável, testar as colônias isoladas em MAC no dia 2 quanto à atividade da oxidase. Se o resultado for negativo, inocular as colônias em tiras do sistema API 20E e incubá-las a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante a noite, de acordo com as instruções do fabricante (POP – API 20E).

**Campylobacter agar** – observar o crescimento de colônias não-hemolíticas, translúcidas e aquosas. Algumas colônias podem apresentar-se sem cor. Testar tais colônias quanto à atividade da oxidase, de acordo com as instruções no MOP – Teste de Oxidase. Se o resultado for positivo, preparar esfregaço e corá-lo através da coloração de Gram (MOP – Coloração de Gram). Examiná-lo quanto à presença de bacilos Gram-negativos, em formato de “asas de gaivota”. Se não forem observadas colônias características no dia 3, a amostra é considerada negativa para *Campylobacter*.

Dia 4 (72 horas após o recebimento da amostra):

**SMAC** – se aplicável, ler as tiras de API20E inoculadas no dia 3. Se o resultado for positivo para *E. coli*, testar a colônia através do Teste de Látex para *E. coli* O157, de acordo com as instruções do fabricante.

**HE** – se aplicável, ler as tiras de API20E inoculadas no dia 3.

**SS** – se aplicável, ler as tiras de API20E inoculadas no dia 3.

#### **Controle de Qualidade**

Todos os meios de cultura devem ser submetidos ao controle de qualidade de acordo com as instruções do fabricante.

#### **Resultados**

Uma amostra é considerada negativa para as espécies bacterianas de interesse nesse estudo quando não há crescimento desses microorganismos após 48 horas de incubação (dia 3) ou quando os testes bioquímicos inoculados nos dias 2 ou 3 não indicam a presença dos patógenos pesquisados.

Todos os resultados devem ser digitados no banco de dados.

#### **Referências**

ATLAS, R.M. Handbook of Microbiological Media. 2. ed. Florida: CRC Press Inc., 1997.

FORBES, B.A; SAHM, D.F; WEISSFELD, A.S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 11. ed. St. Louis: Mosby, 2002.

ISENBERG, H. D. (ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2. ed. Washington: ASM Press, 2004.

MAHON, C.R.; MANUSELIS, G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 2000.

MURRAY, P. R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 8. ed. Washington: ASM Press, 2003.

### ANEXO I - Datos *Cq Campylobacter* sp. (RT-PCR)

Legenda:				Swabs		Cq ≤35	
				positive qPCR result			
				marginal qPCR result			Cq: 35 a 40
				negative qPCR result			
ClientID	gyrA	0046		0092		0137	
0001		0047		0093	1	0138	
0002		0049		0094		0139	
0003		0050		0096		0141	1
0004	1	0051	1	0099		0144	
0005		0052		0100		0145	
0006		0053	1	0101		0146	
0007		0054		0103		0148	1
0009		0055		0104		0149	
0011		0056	1	0105		0150	
0012		0057		0106		0151	
0013		0058		0108		0153	
0014		0060		0109		0154	
0015		0061		0112		0157	
0016		0062		0113		0158	1
0017		0063		0114		0159	
0018		0064		0115		0160	1
0019		0065		0116		0161	
0020		0066		0117	1	0162	
0021		0067		0120		0165	
0022		0068	1	0121		0166	
0023		0069		0122		0167	1
0024		0070		0125		0170	
0026		0072		0126		0171	
0027		0073		0127		0172	
0028		0074		0130		0175	
0029		0075		0131		0176	
0030		0076		0132		0177	1
0031	1	0077		0133	1	0178	
0032		0078		0135		0180	
0033		0079		0285	1	0337	
0034		0080		0286		0338	
0035		0081		0287		0339	
0036		0082		0288	1	0340	1
0037		0083		0289	1	0341	
0038		0085		0290	1	0342	1
0039		0086		0292		0344	1
0040		0087		0293	1	0345	
0041		0088		0294		0346	
0042		0089		0295	1	0347	1
0043		0090	1	0296		0348	
0044	1	0233	1	0298		0350	
0045		0234		0299		0351	1
0181		0235		0300		0352	

0182		0236		0301		0353	
0183		0237		0302		0354	
0184	1	0238		0303		0355	
0185		0239		0304		0356	
0187		0240	1	0305	1	0357	
0188		0241	1	0306		0358	
0189		0242		0307		0359	
0190		0243		0308	1	0360	
0191		0244		0309		0362	1
0192		0245		0311		0364	1
0193		0246		0312		0365	
0195	1	0247		0313		0366	
0196		0249	1	0314		0367	
0197		0250		0315		0368	
0198		0251		0316		0369	
0199		0253		0317		0370	
0200		0254		0318		0371	
0201		0255	1	0319	1	0372	
0202		0256	1	0320	1	0373	
0203		0257		0321	1	0374	1
0204		0258		0322		0375	
0205		0259	1	0323	1	0376	
0206		0260		0324		0377	
0207		0262		0325		0378	
0208		0263		0326	1	0379	
0209		0264	1	0327		0380	
0210		0265		0328	1	0381	
0211		0266		0329	1	0382	
0212	1	0267		0330		0383	
0213	1	0268		0331		0384	
0214		0269	1	0332		0385	
0215		0270		0333		0386	
0217		0271		0334		0387	1
0218		0272		0335		0388	
0220		0273	1	0336		0389	1
0221		0274					
0222		0275					
0223		0276	1				
0224		0277					
0225		0278					
0226		0279	1				
0227		0280					
0228		0281					
0229		0282					
0230		0283					
0231	1	0284	1				
0232							